

**OVARIELLE STEROIDHORMONSEKRETION
VON RINDERN IM VERLAUF VON SUPEROVULATION
UND WÄHREND MULTIPLER SOWIE
TERMINIERTER GRAVIDITÄT**

FLORIAN VON VEH

Disbui. München
1988

Aus dem Institut für Physiologie der
Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für
Milchwirtschaft Weißenstephan
der Technischen Universität München
Direktor: Professor Dr.Dr.h.c. Heinrich Karg
vorgelegt über das Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Ovarielle Steroidhormonsekretion von Rindern
im Verlauf von Superovulation
und während multipler sowie terminierter Gravidität

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
von
Florian von Veh
aus
Kelheim

München 1988

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München**

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. G. Brem

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Literatur	
1.1.	Superovulation beim Rind	1
1.2.	Zum Einsatz von osmotischen Minipumpen	14
1.3.	Hormonelle Sekretionsmuster während der Frühgravidität des Rindes	16
1.4.	Thrombozyten als Indikator der frühen Trächtigkeit	19
2.	Versuchsplanung und -Durchführung	
2.1.	Problemstellung und Versuchsplanung	24
2.2.	Versuchsdurchführung	26
2.2.1.	Tiermaterial	26
2.2.2.	Zeitplan der Manipulationen	28
2.2.3.	Operation und Implantation der Dauerkatheter	31
2.2.4.	Füllen der FSH-Pumpen sowie FSH-Rückgewinnung	33
2.2.5.	Implantation und Wiederentnahme der FSH-Pumpen	35
2.2.6.	Diagnostische Laparatomie	36
2.2.7.	Rektale Palpation	37
2.2.8.	Blutprobenentnahme und -Konservierung	38
2.3.	Versuch "Thrombozytenzählung während der frühen Mehrlingsgravidität des Rindes"	40
2.3.1.	Blutprobenentnahme und -Behandlung	40
2.3.2.	Gewinnung von "platelet-rich-plasma" (PRP) und Herstellung der Zählflüssigkeit	41
2.3.3.	Zählmethodik	41
2.3.4.	Validierung der Thrombozytenzählungen	42
2.4.	Hormonanalytische Verfahren	48
2.4.1.	Allgemeines	48
2.4.2.	Radioimmuntest (RIA)	48
2.4.2.1.	Direkttest	51
2.4.2.2.	Test nach Extraktion	53
2.4.2.3.	Validierung der radioimmunologischen Tests ohne HPLC	54
2.4.3.	Radioimmuntest nach Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC-RIA)	56

2.4.3.1.	Anmerkungen zur Durchführung des HPLC-RIA	56
2.4.3.2.	Ermittlung der Retentionszeit von Östradiol-17 β	57
2.4.3.3.	Arbeitsschritte und technische Details bei der Durchführung der HPLC	59
2.4.3.4.	Validierung des HPLC-RIA	59
2.4.4.	Übersicht über die in den Tests verwendeten Antisera	62
2.5.	Materialien	63
2.5.1.	Chemikalien	63
2.5.2.	Biochemica	63
2.5.3.	Lösungen und Puffer	63
2.5.4.	Medikamente	64
2.5.5.	Geräte und Materialien	65
3.	Ergebnisse	
3.1.	Resultate des Versuchs "Superovulation-Mehrlingsgravidität"	66
3.1.1.	Superovulationsstimulation mittels FSH-p durch Einsatz der Alza osmotischen Minipumpe	66
3.1.2.	Vergleichende Darstellung der beiden Stimula- tionsverfahren Injektion versus Minipumpe	67
3.1.3.	Verzögerung des LH-Gipfels im Falle des Ver- suchstieres "Nanni"	71
3.1.4.	Gegenüberstellung des Verlaufs der Luteolysen nach Zyklussynchronisation und bei Superovu- lation	75
3.1.4.1.	Verlauf von Progesteron im Vergleich	75
3.1.4.2.	Verlauf von LH im Vergleich	76
3.1.4.3.	Verlauf von Östradiol-17 β im Vergleich	77
3.1.5.	Luteolyse bei bestehender Mehrlings- gravidität	81
3.1.5.1.	Spontane Luteolyse bei bestehender Mehr- lingsgravidität	81
3.1.5.2.	Induzierte Luteolyse bei bestehender Mehr- lingsgravidität	82
3.1.6.	Verhalten der fertilitätsspezifischen Hormone während der multiplen Gravidität	85

3.2.	Resultate des Versuchs "Thrombozytenzählung während der frühen Mehrlingsgravidität des Rindes"	88
4.	Diskussion	
4.1.	Zur Durchführung einer Superovulation mit FSH-p an Hand von zwei Stimulationsverfahren und anschließender Luteolyse beim Rind	91
4.2.	Zur Verschiebung des präovulatorischen LH-Gipfels nach Luteolyseinduktion im Zyklus	96
4.3.	Zur Luteolyseinduktion bei bestehender Mehrlingsgravidität	98
4.4.	Hormonelle Sekretionsmuster während der Tage 1 - 24 der frühen Mehrlingsgravidität	101
4.5.	Thrombozytenzahlen des Rindes in Abhängigkeit der multiplen Frühgravidität	102
5.	Zusammenfassung - Summary	105
6.	Literaturverzeichnis	110
	Lebenslauf	

1. Literatur

1.1. Superovulation beim Rind

Die grundsätzliche Möglichkeit der Beeinflussung der Ovarfunktion im Sinne einer Superovulation beim Rind wurde erstmals von Casida et al. (1943) erwähnt, als er die Wirkung von hypophysären Gonadotropinen auf das Ovar untersuchte. In den nachfolgenden Jahren befaßten sich immer wieder Arbeitsgruppen mit dieser Thematik. So berichten Hammond (1949) über die Induktion multipler Ovulationen mit nachfolgender Mehrlingsgravidität beim Rind und Gordon et al. (1962) über den Einsatz von PMSG zur Erzeugung von Zwillings-trächtigkeiten bei der Kuh.

Nachdem dieses Gebiet der Fertilitätsforschung eine Zeitlang in den Hintergrund getreten war, wurde es in den letzten fünfzehn Jahren durch den Einsatz des Embryotransfers wieder aktualisiert. Eine bessere Ausnutzung des vorhandenen Oocytenpotentials wertvoller Spendertiere während einer Brunst ist die Grundmotivation jeder Superovulationsstimulation im Rahmen der Embryotransferprogramme (Wildt et al. 1975). Man versucht dabei möglichst viele Tertiärfollikel anstatt konsekutiv reifen zu lassen gleichzeitig zu stimulieren. Nach erfolgter Ovulation werden die Spenderkühe mit dem Sperma eines gut vererbenden Bullen im Abstand von 12 Stunden 1 - 3 mal besamt (Savage und Mapletoft 1984), die fertilisierten Eizellen nach 6 - 8 Tagen (Hasler et al. 1987) blutig oder unblutig gewonnen und den mit den Spendern brunstsynchronisierten Empfängertieren intrauterin eingepflanzt.

Um die Follikulogenese im Sinne einer Superovulation zu beeinflussen, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Das gelingt durch die einmalige Verabreichung von PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin), durch FSH hypophysären Ursprungs (Foote und Onuma 1970), durch hMG (Human Menopausal Gonadotropin) (Lauria et al. 1982) oder durch eine Kombination von FSH und LH im Verhältnis von 5 : 1 (Brandt und Hoogenkamp 1982). Ein Kriterium für den Erfolg einer Superovulation ist die Anzahl der zur Ovulation gebrachten Follikel.



Die im Rahmen der Embryotransfer-Programme heute am häufigsten eingesetzten Präparate sind PMSG und FSH.

Bei Superovulation mit PMSG werden 1500 bis 3000 I.E. PMSG je nach Gewicht und Größe des Tieres in der Lutealphase (Tag 8 bis 15) als einmalige Injektion zumeist intramuskulär verabreicht (Schneider und Hahn 1979). Die Applikation eines Prostaglandin-analogs zur Luteolyseinduktion erfolgt 48 Stunden danach. Auf Grund der langen biologischen Halbwertszeit von mehr als 10 Tagen bei PMSG (Schams et al. 1979) ist die Injektion von Anti-PMSG-Serum zum Zeitpunkt der Besamung anstrengenswert, um die Anzahl persistierender Follikel zu verringern und die Brunstdauer zu verkürzen (Dhondt et al. 1978, Kummer et al. 1980, Bouters et al. 1983). Tenhumberg und Mitarbeiter (1984) berichten von dem Einsatz eines progesteronhaltigen Ohrimplantats (Norgestomet®) bzw. der Vaginalspirale (Prid®) zu jedem Zeitpunkt des Zyklus' ohne nachfolgende Luteolyseinduktion und kommen zu vergleichbaren Ergebnissen wie mit der herkömmlichen Technik. Die Verweildauer der Implantate beträgt zwischen 9 und 12 Tagen. Am Tag der Entfernung werden hier lediglich 400 I.E. PMSG i.m. verabreicht.

Kommt das Proteinhormon FSH zum Einsatz, so wird es für die Dauer von 4 - 5 Tagen, beginnend ab Zyklustag 8 bis 13, täglich in möglichst abnehmenden Dosierungen appliziert. Wegen der geringen Halbwertszeit dieses Pharmakons von 5 Stunden (Laster 1972a) erfolgt die Behandlung zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden. Die Gesamtmenge des zur Stimulation verwendeten FSH schwankt zwischen 30 und 50 mg. Die Einleitung der Luteolyse erfolgt dann während der noch andauernden FSH-Behandlung 48 Stunden (Schams et al. 1979, Rodrigues und Gregory 1986) nach der 1.FSH-Injektion. Andere Autoren dehnen diese Zeitspanne auf 72 Stunden (Lindsell et al. 1985), bei 5-tägiger Applikationsdauer sogar auf 96 Stunden post "FSH-1" (Pawlyshyn et al. 1986) aus. McBride und Mitarbeiter (1986) verteilten die luteolytische Dosis des PGF_{2α}-Analoge auf zwei gleiche Teile und gaben sie synchron mit den beiden letzten FSH-Injektionen, während Donaldson (1985) die Prostaglandindosis auf drei Applikationen verteilte, welche am 4. Stimulationstag morgens, mittags und abends injiziert wurden.

Analog zu den Versuchen der Arbeitsgruppe Tenhumberg mit PMSG (1984) kommen auch Hill et al. (1986) zu dem Ergebnis, daß der Einsatz des Norgestomet-Implantats in Kombination mit einer FSH-Superoovulation im Vergleich zur obigen Technik zu keinen unterschiedlichen Resultaten führt. Unabhängig vom Zyklusstand des Spendertieres wird das Implantat für die Dauer von 9 Tagen gelegt und 2 Tage vor der Wiederentfernung mit einer 4-tägigen FSH-Behandlung nach schon genanntem Muster begonnen. Die Luteolyse wird 48 und 60 Stunden nach der ersten FSH-Injektion eingeleitet.

In diesem Zusammenhang seien Stone und Mitarbeiter (1984) erwähnt, die das Norgestomet-Implantat in Verbindung mit einer FSH-Superoovulation in der Postpartum-Phase von Rindern testeten und bei allen Tieren zu zufriedenstellenden Ovarreaktionen kamen. Das Implantat wird am Tag 20 p.p. gesetzt und nach 9 Tagen wieder entnommen. Am Tag 27 p.p. wird dann mit einer 4-tägigen FSH-Stimulation begonnen.

Nachdem man davon ausgehen muß, daß die durch die Superovulation angebildeten Follikel nicht alle zum selben Zeitpunkt ovulieren, wird die Besamung in den meisten Fällen ein bis zweimal wiederholt. So werden die Versuchstiere bei Yadav et al. (1986b) 56, 68 und 80 Stunden nach der Luteolyseinduktion inseminiert.

Tenhumberg et al. (1984) besamen ebenfalls dreimal, allerdings mit 72, 84 und 96 Stunden post PG etwas später. Andere Autoren orientieren sich mehr an den äußeren Brunstsymptomen und belegen die Spenderkühe 12 und 24 Stunden nach Brunstbeginn (Stone et al. 1984, Savage und Mapletoft 1986). Pawlyshyn und Mitarbeiter (1986) begnügen sich ohne negative Erfahrungen mit einer einzigen Insemination 18 bis 24 Stunden nach Brunstbeginn. Um die Ovulation zu beschleunigen, können 3000 bis 5000 I.E. hCG intravenös injiziert werden (Görlach und Hahn 1983).

Betrachtet man die verwendeten Präparate, zeichnet sich besonders bei den $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analoge (PG) und bei FSH aus Schweinehypophysen (FSH-p) eine weitgehend einheitliche Tendenz ab. So werden international bei allen Forschungsvorhaben, die eine Luteolyse beim Rind beinhalten, nahezu nur zwei Präparate eingesetzt :

Zum einen Cloprostenol (Estrumate[®], ICI, GB) in einmaliger luteolytischer Dosis von 0.5 mg (Karg et al. 1976, Karg und Schams 1982, Etherington et al. 1986). Dobson und Mitarbeiter (1975) verwenden 0.75 mg Cloprostenol als einmalige intramuskuläre Injektion zur Einleitung der Luteolyse während Yadav et al. (1986b) zweimal 0.5 mg im Abstand von 16 Stunden intramuskulär applizieren.

Zum anderen kommt das PGF_{2α}-Präparat Lutalyse (Dinoprost[®], Upjohn, Kalamazoo) zum Einsatz. Die Angaben der Autoren hier schwanken zwischen einmalig 25 mg i.m. (Watts und Fuquay 1985, Barnes et al. 1982), zweimal 25 mg innerhalb von 12 Stunden (McBride et al. 1986, Hill et al. 1986) und dreimal 10 mg im Abstand von 6 Stunden (Donaldson 1985) bzw. einmal 30 mg (Goff et al. 1986).

Nahezu alle sich mit Superovulation (SO) bzw. Embryotransfer (ET) befassenden Forschungsgruppen berufen sich beim Einsatz von FSH-p auf den Hersteller Burns Biotech, Nebraska, USA (Bindon et al. 1986, Callesen et al. 1986, Zalesky et al. 1986, u.v.a.). Nur wenige Autoren berichten von anderen Präparaten. In diesem Zusammenhang setzen Yadav und Mitarbeiter (1986b) in Kanada bei ihren Versuchen ein Präparat der Firma Schering, Montreal, ein.

Kommt PMSG zum Einsatz, gehen die Angaben der Autoren sehr auseinander. Alcivar et al. (1984) verwenden Pergonal[®], Serono Lab., USA, Schams und Mitarbeiter (1979) stimulieren mit Anteron[®] von Schering (Berlin). Die Forschungsgruppe um Greve (Callesen et al. 1986) bevorzugte ein dänisches Präparat (Antex[®], Leo Pharma., DK) und Yadav et al. (1986b) setzten ein PMSG kanadischer Herkunft (Ayerst, Montreal) ein.

Betrachtet man nun die Hormonprofile der superovulierten Tiere, so sind einige Beurteilungskriterien von Wichtigkeit. In diesem Zusammenhang verdient der präovulatorische LH-Gipfel, sein zeitlicher Abstand von der Luteolyseinduktion und seine Beziehung zur Brunst besondere Aufmerksamkeit. Desweiteren sind von Interesse der Zeitraum von der ersten Prostaglandininjektion bis zum Auftreten der äußeren Brunstsymptome, die Zeitspanne bis Progesteron

nach Luteolyseinduktion auf basale Werte fällt und die Sekretionsmuster von FSH und Östradiol-17 β in Verbindung mit der Follikelanbildung und dem Auftreten von Östruserscheinungen. Obige Kriterien haben einen entscheidenden Einfluß auf den optimalen Besamungszeitpunkt und geben Aufschluß über die Ursachen der individuellen Ovarreaktion von Rindern. Besonders seit etwa zehn Jahren bemüht man sich, in den Embryotransferprogrammen eine möglichst hohe Fertilitäts- und Erfolgsrate zu erlangen.

Auffallend oft erwähnen Forschungsgruppen in ihren Berichten superovulierte Spendertiere, die keine oder nahezu keine Ovarreaktion zeigen, obgleich sie, klinisch offenbar gesund, denselben Manipulationen unterworfen werden wie die gut reagierenden Tiere.

So berichten Schams und Mitarbeiter (1979) bei ihren vergleichenden Versuchen mit PMSG und FSH von einer großen Variabilität hinsichtlich der Reaktion auf die Stimulation, die zumindest beim PMSG von der Dosierung und dem Zyklustag der Behandlung unabhängig ist. Sie führen das auf die Ausgangslage der Ovarien zurück, insbesondere ob und wieviele kleinere Tertiärfollikel bereits bei Stimulationsbeginn vorhanden sind. Saumande (1977) kommt diesbezüglich zu derselben Vermutung.

Auch in neuerer Zeit stellen die Autoren immer wieder fest, daß die nicht vorhersehbare, individuelle Reaktion des Einzeltieres nach wie vor das größte Problem bei dieser biotechnischen Maßnahme darstellt (Donaldson 1985). Saumande und Mitarbeiter (1985) bestätigen dies bei ihren Untersuchungen über die Beziehung von Ovarreaktion nach SO zum Milchprogesterongehalt am Tag 3 nach der Besamung. Sie kommen dabei zu dem Ergebnis, daß bereits am 3. Tag post KB die nicht oder schlecht reagierenden Tiere anhand der Progesteronkonzentration in der Milch von den gut reagierenden unterschieden werden können und wiederholen somit, was Schams et al. (1979) anhand des Progesteronspiegels im Blutplasma bereits postulierten. Bindon et al. (1986) erkennen keinen Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und Reaktion bei Superovulation. Sie glauben in einer erhöhten, basalen LH-Sekretion während der SO einen reduzierenden Einfluß auf die vielfältigen Ovarreaktionen zu sehen. Die Arbeitsgruppe um Greve (Callesen et al. 1986)

kommt zu dem Schluß, daß der Anteil schlecht reagierender Tiere von der Stimulationsmethode (FSH oder PMSG) unabhängig ist.

Nach Becze et al. (1979) ist der Erfolg einer Superovulation vom Funktionszustand der Ovarien abhängig. So sollten sich ihrer Ansicht nach in der Zyklusmitte außer einem gut entwickelten Corpus luteum keinerlei weitere, größere Funktionsgebilde auf dem Ovar befinden. Reagiert ein Spendertier sehr gut auf die Superovulation, können bis zu 35 Eizellen gewonnen werden (Claus und Karg 1981). Roselius (1985) berichtet wie auch Saumande et al. (1985) von durchschnittlich 8,1 gewonnenen Embryonen je Spendertier. Mill et al. (1986) kommen mit Durchschnittszahlen von 9,8 Ovulationen pro Tier zu einem vergleichbaren Ergebnis. Hasler und seine Mitarbeiter (1987) liegen mit ihrem aus einem Langzeitexperiment von 6½ Jahren stammenden Ergebnis von 10,7 Embryonen je Tier noch etwas darüber.

Eine besondere Bedeutung kommt dem Zeitraum zwischen dem präovulatorischen LH-Gipfel und der Ovulation zu (Moghissi 1980). Zunächst mußte man davon ausgehen, daß bei einer Superovulation eine besondere, von physiologischen Verhältnissen abweichende Situation vorliegt. Dabei spielt auch die vorausgegangene Luteolyse, ob induziert oder nicht, eine Rolle. So berichten die Autoren aus früheren Arbeiten über die Luteolyseinduktion mit einem Prostaglandinanalogen ohne vorausgegangene Superovulation, daß sie in ihren hormonellen Sequenzen einer physiologischen Luteolyse gleichwertig sei (Karg et al. 1976, Dobson et al. 1975). Es werden Progesteronwerte < 1 ng/ml Plasma innerhalb von 24 Stunden nach Prostaglandinapplikation erreicht. Der darauffolgende Zyklus scheint "normal" zu verlaufen.

Daß hinsichtlich der zu Verfügung stehenden Prostaglandinanaloga in ihrer Wirkung keine wesentlichen Unterschiede bestehen wurde von Schams und Karg (1982) demonstriert.

Den Zeitraum zwischen PG-Injektion in der mittleren Lutealphase (Tag 10,11) und präovulatorischem LH-Gipfel geben Karg et al. (1976) im Mittel mit 82 Stunden an, allerdings mit Abweichungen bis zu 20 Stunden. Zu denselben Resultaten gelangen Dobson et al.

(1975) und auch Yadav et al. (1986b). Bei ihren Forschungen erfolgte der LH-Gipfel zwischen 60 und 100 Stunden nach der Luteolyseinduktion.

Die Ovulation der multipel angebildeten Graaf'schen Follikel erfolgt im Mittel 27 bis 29 Stunden nach dem präovulatorischen LH-Gipfel (Bernard et al. 1983, Christenson et al. 1975), während Karg et al. (1976) bei ihren Versuchen zur Zyklussynchronisation diese Zeitspanne mit 23 Stunden angeben. Bezogen auf die Brunstsymptome ovulieren etwa 70% der Tiere 26 bis 30 Stunden und 25% 30 bis 36 Stunden nach Beginn der Brunst (Christenson et al. 1975).

Watts und Fuquay (1985) versuchten eine Beeinflussung der Luteolyseinduktion durch den Zyklustag zu ermitteln und kommen zu dem Ergebnis, daß die PG-Injektion im frühen Diöstrus (Tag 5-7) zu den schlechtesten Resultaten im Vergleich zum mittleren (Tag 8-11) oder gar späten (Tag 12-15) Diöstrus hinsichtlich Reaktion und Konzeption führt. Tanabe und Hann (1984) dagegen erkennen im frühen (Tag 7) und späten (Tag 15) Diöstrus eine im Vergleich zum mittleren Diöstrus spontanere und "kompaktere" Reaktion auf das Prostaglandinanalogen, pflichten Watts und Fuquay (1985) aber in der Angabe bei, die Zeitdauer nach Luteolyseinduktion in der frühen Lutealphase sei die kürzeste. Refsal und Seguin (1980) sehen wie auch King et al. (1982) eine Verkürzung der Zeitspanne zwischen der Luteolyseinduktion und dem Brunstbeginn im frühen Diöstrus, unterscheiden jedoch nur zwischen frühem (Tag 5 - 8) und spätem (Tag 9 - 17) Diöstrus.

Vergleicht man nun die Luteolyse bei Superovulation mit der induzierten Luteolyse ohne vorhergehende Stimulation, so ergeben sich hier auffallende Unterschiede.

Schams et al. (1979) kommen bei ihren vergleichenden Untersuchungen über Superovulation durch PMSG und FSH zu der Aussage, daß der präovulatorische LH-Gipfel bei allen superovulierten Tieren nahezu mit dem Beginn der Brunst zusammenfällt und zwar dergestalt, daß dieses Geschehen um so ausgeprägter ist, je besser die Tiere auf die Stimulation reagieren. So treten die LH-

Maxima bei den schlecht reagierenden Kühen im Gegensatz zu den guten Reagenten "erst" 8 Stunden nach Brunstbeginn auf. Auch ist der Östrogenanstieg vor dem LH-Gipfel bei den gut reagierenden Tieren sehr viel deutlicher und spiegelt die angebildeten Follikel jedoch ohne strenge Korrelation zwischen Follikelzahl und Östrogenkonzentration wider.

Diese oben beschriebene Vorverlagerung des LH-Maximums an den Anfang der Brunst wird nahezu von allen sich mit der Thematik befassenden Arbeitsgruppen beschrieben (Barnes et al. 1982, Jensen et al. 1982, Lindsell et al. 1985, Callesen et al. 1986, Goff et al. 1986, Yadav et al. 1986a).

Die mit dem Brunstbeginn zusammenfallenden LH-Gipfel guter Reagenten liegen im Durchschnitt bei 38 bis 44 Stunden post PG (Schams et al. 1979, Barnes et al. 1982, Callesen et al. 1986, Yadav et al. 1986a). Die Brunst beginnt etwa 36 bis 40 Stunden nach Luteolyseinduktion, was seine Ursache wohl in der erhöhten Östrogenproduktion der vermehrt angebildeten Follikel findet (Schams et al. 1979).

Betrachtet man den Progesteronanstieg nach den erfolgten Ovulationen, so können besonders bei den gut reagierenden Tieren bereits nach 48 bis 60 Stunden Konzentrationen über 1 ng/ml Plasma je nach Anzahl der angebildeten Corpora lutea gemessen werden (Schams et al. 1979). Daraus ergibt sich auch die Möglichkeit, ab dem dritten Tag nach der Besamung gute von schlechten Reagenten zu differenzieren (Saumande 1977, Schams et al. 1979).

Die Hormonprofile während und nach der Stimulation zeigen keine Unterschiede zwischen PMSG und FSH auf, lediglich die Progesteronwerte sind nach PMSG-Stimulation in ihren Absolutkonzentrationen höher als jene nach FSH, was Schams und Mitarbeiter (1979) auf die lang anhaltende luteotrope Wirkung von PMSG zurückführen. Bei einer FSH-Stimulierung steigen die im peripheren Plasma gemessenen FSH-Konzentrationen bereits nach 36 Stunden kaskadenartig an (Barnes et al. 1982, Schams et al. 1979), um nach dem präovulatorischen LH-Gipfel wieder auf Basalwerte zurückzufallen.

Nachdem sich bei der heute praktizierten Stimulierung zur Superovulation mit PMSG und FSH zwei Möglichkeiten ergeben, liegt es nahe, die beiden im direkten Vergleich zu betrachten. So berichten Callesen et al. (1986) von einer geringfügig besseren Ovarreaktion bei FSH (32 mg) als bei PMSG (2500 I.E.), aber einem etwas schnelleren Erreichen des LH-Maximums nach PG-Applikation bei PMSG, was sie auf höhere präovulatorische Östrogenkonzentrationen zurückführen. Andere Autoren (Yadav et al. 1986b) geben eine größere Differenz zwischen PMSG (37 h) und FSH (52 h) an betreffend die Zeit von der Luteolyseinduktion bis zum präovulatorischen LH-Gipfel.

In weiteren Arbeiten erwähnen Greve et al. (1984a, 1984b) bei PMSG-Stimulation eine im Vergleich zu FSH erhöhte Bereitschaft zu abnormalen LH- und Progesteron-Profilen wobei letztere mit einer geringeren Zahl übertragbarer Embryonen verbunden waren. Zudem kann nach der Injektion von PMSG im Gegensatz zu FSH ein Progesteronanstieg verzeichnet werden, was Schams et al. (1979) mit der LH-Wirksamkeit auf den ja noch bestehenden Gelbkörpers erklären. Auch der Progesteronanstieg nach der Besamung erfolgt wohl aus demselben Grunde nach PMSG-Einsatz schneller und führt zu höheren Absolutkonzentrationen (Schams et al. 1979, Yadav et al. 1986b).

Bezogen auf die Anzahl der angebildeten Corpora lutea, der wiedergefundenen Eizellen und der daraus erzielten Trächtigkeiten scheint der Einsatz von hypophysären Gonadotropinen bei einer Superovulation eine größere Effizienz zu erbringen als der Gebrauch von Serumgonadotropinen (Elsden et al. 1978).

Die überaus große Variabilität der Ovarreaktionen auf eine Superovulation gleich welcher Art war der Grund, weshalb man sich besonders in jüngerer Zeit erneut mit möglichen Einflüssen verschiedener Faktoren auf die Stimulationsergebnisse befaßte.

So berichten Looney et al. (1981) bei Einsatz der gleichen Gesamtmenge FSH von einer höheren Ovulationsrate nach einer einmal täglichen Applikation gegenüber einer täglich zweimaligen.

Barnes und Mitarbeiter (1982) erkunden den Einfluß der FSHp-Dosis auf die Luteolyse und die Ovulationsrate mit dem Ergebnis, daß bei einer hohen Gesamtdosis (50 mg) gegenüber einer niedrigen (32 mg) die Ovulationsrate signifikant höher und die Zeitspannen von PG-Applikation bis zur Brunst bzw. LH-Maximum verkürzt sind. Auch treten die präovulatorischen LH-Gipfel bei Superovulation mit FSH-p einheitlicher auf (40.8 ± 2.2 h post PG) als bei Luteolyse-induktion ohne vorherige Follikelstimulierung (111 ± 14.2 h). Pawlyshyn et al. (1986) zeigen in ihren Versuchen über unterschiedliche FSH-Gesamtmen gen (15, 30, 45, 60 mg) keine signifikanten Unterschiede in den Zeitintervallen (Brunst 41.7 h nach PG) auf. Sie ermitteln jedoch eine optimale Gesamtdosis von 45 mg. Höhere Dosierungen bedingen eine Verringerung der Ovulationen und fertilisierten Oozyten.

Bei einer Stimulation mit unterschiedlichen Dosen PMSG kommen Henricks et al. (1973) zu einer besseren Reaktion mit 3200 I.E. als mit 1600 I.E., was sich dann auch in einer stärkeren Erhöhung von Östradiol-17 β und Progesteron niederschlägt.

Die Auswirkungen von FSH verschiedener Herkunft werden von Laster (1972b) untersucht. Er zeigt eine deutlich bessere Stimulationswirkung auf die Follikulogenese beim Rind nach Applikation von Schweine-FSH (FSH-p) geringer Dosierung auf als beim Einsatz von bovinem und ovinem FSH höherer Dosierung. Er führt das auf eine höhere LH-Aktivität bei FSH-p zurück. In Anlehnung an obige Aussage infundierten Armstrong und Opavsky (1986) Ratten via einer Alzet osmotischen Minipumpe ein FSH-Präparat, das nur etwa 20% der LH-Aktivität des nahezu ausschließlich bei SO/ET-Programmen eingesetzten FSH-p (Burns-Biotec) hat. Sie bestätigen die Vermutungen von Laster (1972b) und kamen zu dem Schluß, daß geringe LH-Aktivitäten, ob natürlich oder verunreinigt, notwendig sind für eine effektive Superovulation, bei zunehmenden Konzentrationen aber einen negativen Einfluß auf die Ovulationsrate haben.

Nachdem das FSH-p von Burns Biotec so häufig Verwendung findet, war es notwendig, die verschiedenen Chargen dieses Hormons auf ihre biologische Aktivität zu prüfen. Bei einem Versuch, in dem sechs willkürlich ausgewählte Chargen von FSH-p der Jahre 1979-82

auf ihre superovulatorische Wirkung untersucht wurden, ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Ovarreaktionen wie auch der Zahl der gewonnen Embryonen (Hill et al. 1984).

Neben der gebräuchlichsten Möglichkeit der intramuskulären Verabreichung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zur Luteolyseinduktion besteht noch die Variante der intravenösen Injektion. Nach i.v. Applikation des Prostaglandins in Verbindung mit einer Superovulation durch FSH wie auch PMSG kommt es im Gegensatz zur i.m. Injektion zu einem um ca. 10 Stunden späteren Auftreten der charakteristischen LH-Gipfel, die Brunstsymptome jedoch werden nicht beeinflusst (Alcivar et al. 1984).

Schon vor mehr als einem Jahrzehnt erkannten Elsdon und Mitarbeiter (1974) einen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der PMSG-Injektion und der Ovulationsrate. Sie erwähnen bessere Resultate bei einer PMSG/ $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Behandlung in der Mitte des Zyklus als bei alleiniger PMSG-Anwendung ohne $\text{PGF}_{2\alpha}$ am Tag 16. Greve (1976) weist ebenfalls auf eine Beziehung zwischen der Anzahl der erfolgten Ovulationen und dem Zyklustag der PMSG-Anwendung hin. Sreenan und Gosling (1977) zeigen, daß die endogene Progesteronkonzentration (Tag 3 vs. Tag 10) die Ovulationsrate nicht so sehr beeinflusst wie der Zeitpunkt der PMSG-Applikation. Hier ergeben sich bei der Injektion von PMSG am Tag 10 höhere Ovulationsraten als am Tag 3.

Bei Untersuchungen über den Einfluß des Zyklustages, an dem mit der FSH-Stimulation begonnen wird, auf die Ovarreaktion der Spendertiere ergibt sich ein deutliches Optimum für die Tage 9 bzw. 12 im Vergleich zu den Tagen 3 und 6 (Lindsell et al. 1985). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Hill und Mitarbeiter (1984). Sie berichten, die Zahl der Ovulationen sei von dem Beginn der FSH-Behandlung innerhalb der Tage 8 bis 13 unabhängig. Hasler et al. (1987) sehen ebenfalls keinen Einfluß des Stimulationsbeginns auf die Zahl der Embryonen, falls die erste FSH-Applikation zwischen Zyklustag 8 und 14 erfolgt.

Die Luteolyse wird bei den ET-Programmen in der Regel 48 Stunden nach Stimulationsbeginn medikamentell induziert. Aber auch spätere Zeitpunkte werden zur Luteolyseinduktion herangezogen (Lindsell et al. 1985, Pawlyshyn et al. 1986). Erfolgt die PG-Applikation innerhalb 48 bis 72 Stunden nach Stimulationsbeginn, ergeben sich keine Auswirkungen auf die Zahl der übertragbaren Embryonen (Elsden et al. 1978, Rodrigues und Gregory 1986).

Saumande und Chupin kamen 1982 zu dem Schluß, daß keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Reaktionsbereitschaft auf Superovulation zwischen den beiden Eierstöcken bestehen.

Yadav und Mitarbeiter (1986a) untersuchen in einem Experiment mit FSH-stimulierten Rindern die Zeitverhältnisse der multiplen Ovulationen mit dem Ergebnis, daß 80% der angebildeten Follikel 65 bis 77 Stunden nach Luteolyseinduktion ovulieren. Der Vorgang der Ovulation dauert etwa 12 Stunden und beginnt ca. 22 Stunden nach dem präovulatorischen LH-Gipfel. 84 Stunden nach PG sind keine Ovulationen mehr nachweisbar. Die Autoren verweisen anhand der obigen Resultate auf die Möglichkeit, durch eine einmalige Besamung mit doppelter Spermamenge 60 Stunden nach Prostaglandin-injektion eine ausreichende Fertilität zu erzielen. Callesen und Mitarbeiter (1986) geben den Zeitpunkt, an dem 80% der Follikel ovuliert haben, mit 28 Stunden nach dem LH-Gipfel etwas später an.

Wiley et al. (1982) konnten bei mit FSH superovulierten Kühen keinen signifikanten Einfluß des Gonadotropins auf den Spermientransport im Eileiter erkennen. Durch Versuche mit einem synthetischen Antiprogesteron beweisen McBride und Mitarbeiter (1986) die den Transport der ovulierten Oozyten durch den Eileiter beschleunigenden Eigenschaften von Progesteron.

In einem über 6 Jahre dauernden Embryotransferprogramm an mehr als 800 Tieren untersuchten Hasler et al. (1987) die verschiedenen möglichen Faktoren, die auf die Effektivität des Programms Einfluß nehmen könnten. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß weder Rasse und Alter (bis 15 Jahre), noch Laktations- wie auch Fertilitätsstadium des Spendertieres einen Einfluß auf die nachfolgende

Trächtigkeit der Empfängerkühe haben. Auch früher zurückliegende Brunstsynchronisationen haben keinen Einfluß. Gleichwohl hat es deutlich negative Auswirkungen auf die Trächtigkeitsrate der Empfänger, wenn die Brunstsynchronie natürlich und nicht induziert ist oder die gewonnenen Embryonen 9 Tage und älter sind. Die Verfasser postulieren eine gute Zyklussynchronie von Spender und Empfänger als den entscheidenden Faktor für eine positive Embryotransferbilanz. Als für den Endokrinologen interessant erweist sich die Feststellung der Autoren, daß, wie auch schon andere Verfasser berichteten (Booth et al. 1975, Schams et al. 1979), eine lineare Beziehung zwischen der Höhe der Progesteronkonzentration und der Anzahl der angebildeten Corpora lutea besteht.

Trotz aller bislang erreichten Perfektion in der technischen Ausführung der Superovulation mit Embryotransfer berichten die meisten Autoren von Problemen. Abgesehen von der bereits erwähnten, unterschiedlichen Reaktion der Einzeltiere auf die Stimulation erscheint ein wesentlicher Parameter zu häufig großen Schwankungen unterworfen. So erwähnen Callesen und Mitarbeiter (1986) einen nicht unerheblichen Anteil (22%) der Versuchstiere, die keinen oder zumindest einen verspäteten LH-Gipfel aufwiesen ausgehend von einem regulären LH-Maximum innerhalb 22 bis 54 Stunden post PG. In den meisten Fällen (80%) fehlte der LH-Gipfel ganz, wobei die Verfasser über den Zeitraum nach 83 Stunden post PG keine Angaben mehr machen. Auch Donaldson (1985) berichtet von abnormalen LH-Profilen und bestätigt Greve et al. (1984b) mit ihrer Aussage, daß eine Abweichung der LH-Sekretion betreffend den Zeitpunkt des präovulatorischen LH-Maximums einen höheren Anteil nicht übertragbarer Embryonen nach sich zieht. Er weist FSH den Haupteinfluß auf die Gesamtzahl der Embryonen zu, wohingegen LH in erster Linie bei der Oozytenreifung eine Rolle spielt. In Verbindung mit diesen Zusammenhängen demonstrieren Goff et al. (1986) die negativen Auswirkungen von basalen Progesteronkonzentrationen > 1 ng/ml Plasma während der superovulatorischen Brunst auf den LH-Gipfel. Die Autoren erkennen keinen Zusammenhang zwischen follikulärer Steroidkonzentration und der Oozytenreifung. Sie entdecken ebenfalls fertig ausgereifte Eizellen (Metaphase II) bei Versuchstieren ohne LH-Maximum.

Savage und Mapletoft (1984) konnten in einem Experiment keine positiven Auswirkungen durch den Einsatz von Gonadotropin-Releasinghormon (250 µg GnRH) bei Beginn der Brunst nach vorausgegangener Stimulation mit 28 mg FSH aufzeigen. Sie sehen sich trotzdem ebenfalls mit großen Schwankungen des LH-Gipfels konfrontiert.

1.2. Zum Einsatz von osmotischen Minipumpen

Fast alle über die Superovulation berichtenden Autoren wählten als Applikationsmodus der Prostaglandine bzw. der Gonadotropine die intramuskuläre Injektion. Die Möglichkeit der intravenösen Verabreichung von FSH über den Zeitraum von 72 Stunden nutzte schon Laster (1972b). Er verwendete damals eine konstant arbeitende Infusionspumpe mit der er den Tieren eine FSH-Lösung infundierte (ca. 0.4 ml/Min.).

In neuerer Zeit berichten Armstrong und Opavsky (1986) vom Einsatz anderer technischer Hilfsmittel bei der konstanten Applikation von FSH. Sie benutzten dabei eine Alzet osmotische Minipumpe mit der sie juvenilen Ratten subkutan FSH verabreichten. Besonders die geringe biologische Halbwertszeit dieses hypophysären Gonadotropins von etwa 5 Stunden (Laster 1972a) und die daraus resultierende Notwendigkeit der häufigeren Injektion scheinen den Einsatz solcher Minipumpen lohnenswert zu machen.

Mitte der 70iger Jahre entwickelt, bieten die osmotischen Minipumpen eine sehr vielfältige Einsatzmöglichkeit unter der Voraussetzung, daß das zu verabreichende Präparat in wässriger Form vorliegt. Ihr Wirkungsprinzip beruht auf einer osmotisch aktiven Verbindung innerhalb einer semipermeablen, jedoch ihre Form behaltenden Kapsel. Die Kapselmembran läßt extrazelluläre Flüssigkeit aus der Umgebung gemäß dem osmotischen Gradienten in ihr Inneres passieren. Die zu applizierende Flüssigkeit befindet sich im Inneren eines flexiblen Schlauches, der von dem sich konstant ausdehnenden osmotischen Agens ebenso konstant komprimiert wird. Dieses Flüssigkeitsreservoir kommuniziert mit dem die Kapsel umgebenden Gewebe über eine dünne, integrierte Kanüle, durch die

das Präparat dann gleichmäßig und über einen definierten Zeitraum abgegeben wird. Das über diesen Zeitraum konstante Applikationsvolumen wird demnach durch zwei Parameter kontrolliert: Zum einen durch die Permeabilität der semipermeablen Kapselmembran und zum anderen durch die Charakteristika der osmotisch aktiven Substanz (Fara 1985, Theeuwes 1987; siehe Abb. 1).

In vitro/in vivo Vergleichsuntersuchungen bei 37°C zeigten eine exzellente Übereinstimmung von mehr als 90% (Theeuwes und Eckenhoff 1980). Sowohl das hydrodynamische Profil und der pH-Wert des äußeren Mediums wie auch die Temperatur im Bereich zwischen 4 und 42°C haben keinen Einfluß auf die Abgaberate der Minipumpen (Theeuwes und Eckenhoff 1980). Alle Teile der durch Gammastrahlen (^{60}Co) sterilisierten Minipumpen sind sehr gut gewebsverträglich (Eckenhoff und Yum 1981).

Verfügbar zur Implantation im Tierexperiment sind die bereits im Handel erhältlichen Minipumpen in zwei Größen (Volumen 0.2 ml und 2 ml) und die wiederum mit je zwei Abgabekonstanten (0.5/1 $\mu\text{l/h}$ bzw. 5/10 $\mu\text{l/h}$), wobei letztere in den jeweils maximal möglichen intrakorporalen Gesamtverweilzeiten von 14 bzw. 7 Tagen ihren Ausdruck finden (Yum und Wright 1980).

Fara (1985) erkennt aufgrund der angebotenen Größen die Einsatzmöglichkeiten der Minipumpen im Tierexperiment, zeigt ein Versuchstierspektrum von der Maus über den Hund bis zum Großtier auf und schließt für zukünftige Experimente auch die wechselwarmen Individuen nicht aus. Insbesondere Substanzen kurzer biologischer Halbwertszeit (Peptide) sind seiner Ansicht nach prädestiniert für eine längerdauernde Applikation mit osmotischen Minipumpen.

Bedingt durch die Kombinationsvielfalt und angeregt durch die in der Humanmedizin bei vorklinischen Tests gemachten positiven Erfahrungen mit mehr als 150 bioaktiven Substanzen, die via osmotische Minipumpen appliziert wurden, zeigen Yum und Wright (1980) eine optimistische Perspektive für die Zukunft auf. So können die Pumpen subkutan, intraperitoneal, oral, rektal ja sogar intravenös bzw. intracerebrospinal mit Erfolg eingesetzt werden, was Versuche von Armstrong und Opavsky (1986) mit FSH bei Ratten und

Dören et al. (1986) mit Indometazin bzw. PGF_{2α} beim Kaninchen eindrucksvoll demonstrieren.

Der durch eine Vielzahl aufeinanderfolgender Injektionen besonders beim Tierexperiment zweifelsohne einwirkende und möglicherweise resultatsverfälschende Versuchsstreß wird durch die subtile und doch exakte Applikationsweise der osmotischen Pumpe minimiert (Fara 1985). Der Autor sieht in diesem Zusammenhang in der Endokrinologie aufgrund der psychischen Wechselwirkungen einen zukunftssträchtigen Anwendungsbereich.

1.3. Hormonelle Sekretionsmuster während der Frühgravidität des Rindes

In der Frühgravidität unterscheidet man bei der Spezies Rind drei morphologische wie auch funktionelle Entwicklungsabschnitte.

Die ersten drei Tage entsprechen dem Entwicklungsbeginn des Embryos im Eileiter. Er umfaßt die Befruchtung und die ersten drei Teilungsabschnitte (bis zum 8-Zell-Stadium) und endet mit dem Transport des Konzeptus durch den Isthmus des Eileiters in die Uterushornspitze (Crisman et al. 1980).

Zum Zeitpunkt der Ovulation ist ein zweiter FSH-Gipfel nachweisbar, dem unter Umständen eine Rolle bei der Entwicklung neuer Follikel zukommt. Als Folge dieser FSH-Sekretion können auch in der frühen Lutealphase erneut relativ hohe Östradiolkonzentrationen bei bereits erhöhten Progesteronwerten in der Vena cava caudalis (VC) gemessen werden (Walters et al. 1984, Walters und Schallenberger 1984). Bei einer optimalen Lage der Katheterspitzen wenig cranial der Einmündungsstellen der Venae ovaricae in die Vena cava caudalis können bereits am Graviditätstag 3 pulsatile Progesteronausschüttungen > 100 ng/ml Plasma nachgewiesen werden (Abele 1987).

Der nächste Abschnitt umfaßt die Entwicklung des Embryos im Uterus vom 8-Zell-Stadium bis zur Blastozyste in der Zona pellucida. Vier Tage nach der Ovulation befindet er sich im 16-Zell-Stadium,

die Tage 5 und 6 entsprechen dem frühen Morulastadium. Daran schließt sich der einschneidende Vorgang der Blastulation an, der sich an den Tagen 7 bis 8 vollzieht. Am 8. Tag ist die Differenzierung in Embryonalknoten und Trophoblast, das Blastozystenstadium, erreicht. Am 9. Tag nach KB schlüpft die Blastozyste aus der Zona pellucida.

In diesem Zeitraum steigt der Progesteronspiegel auch im peripheren Blut infolge der Ausreifung des Corpus luteum und der zunehmenden Sättigung der Fettdepots konsekutiv an. Im Gegensatz dazu bleiben die Konzentrationen von Östradiol-17 β während der Frühgravidität selbst in der Vena cava gering (Schallenberger et al. 1986), wohingegen sie während des Brunstzyklus ansteigen können. Insbesondere an den Tagen 6 bis 8 ist der Embryotransfer möglich und auch üblich (Kauffold und Thamm 1985).

Den dritten und letzten Abschnitt der Frühgravidität stellt die Expansion und Implantation des Embryos nach dem Schlüpfen aus der Zona pellucida dar. Ab dem 12. Tag verliert die geschlüpfte Blastozyste ihre kugelige Form durch ein zunehmendes Längenwachstum. Nahezu zwei Drittel des betreffenden Uterushornes werden bereits am 15. Tag durch das Chorion ausgefüllt. Am Tag 18 nach KB kleidet das Chorion nun schon das ganze Uterushorn aus. Es beginnt die Nidation, die am 22. Tag im Bereich des Embryos abgeschlossen ist (Leiser 1975).

In den hormonellen Sekretionsmustern spiegeln sich obige Vorgänge hauptsächlich durch immer höher werdende Progesteronkonzentrationen wieder, die sich nach 3 bis 4 Wochen auf einem gewissen Plateau einpendeln. Östradiol-17 β wird in der frühen Trächtigkeit nach einem nur mäßigen initialen Anstieg 3 bis 6 Tage nach der Besamung kaum sezerniert, zeigt aber nach einem relativen Tiefstand um den Tag 21 einen deutlichen Anstieg ab dem Tag 23, was Schallenberger et al. (1986) auf eine zunehmende Sekretion des wachsenden Trophoblasten zurückführen. Im Embryo selbst konnte nur eine sehr geringe Östrogensynthese beobachtet werden (Gadsby 1982).

Trotz des fortbestehenden negativen "Feedback" von Progesteron bei allerdings geringeren Östradiol-17 β -Konzentrationen konnten Schallenger et al. (1985, 1986) ab dem Tag 14 eine Erhöhung der Amplitude der LH-Ausschüttung mit maximalen Absolutkonzentrationen bis zu 3 ng/ml nachweisen. Die Autoren vermuten eine veränderte hypothalamische Empfindlichkeit gegenüber Progesteron oder eine embryonale Stimulierung der Hypothalamus-Hypophysenachse, die selektiv auf LH wirkt.

Spätestens am 16. Graviditätstag muß der Embryo seine Anwesenheit signalisiert haben wenn der Gelbkörper bestehen bleiben soll (Moor und Rowson 1966, Betteridge et al. 1980). Ist das nicht der Fall, so kommt es zu den für die Luteolyse charakteristischen, mehrstündigen PGF $_{2\alpha}$ -Ausschüttungen (Thatcher et al. 1985, Meyer et al. 1986).

Die selektive Erfassung nur der uterinen Blutdrainage ergab bereits für die Zeit 7 - 10 Tage post conceptionem erhöhte Östradiol-17 β -Konzentrationen, die Schallenger und Mitarbeiter (1986) zu dem Schluß veranlaßten, das Steroid könne schon so früh vom Trophoblasten sezerniert werden. Dies wird von Abele (1987) in seiner Dissertation bestätigt. Er mißt in den ersten drei Tagen der Trächtigkeit kaum Östrogenkonzentrationen, die aber dann bis zum Tag 5 trotz guter Katheterposition in der Vena cava caudalis auf Werte bis zu 12 pg/ml Plasma ansteigen, um am Tag 7 ein vorübergehendes Minimum von 4 pg/ml zu erreichen. Ein allmähliches Ansteigen von Östradiol-17 β ab dem Graviditätstag 25 schließt sich daran an.

Glencross und Pope (1981) beschreiben ebenfalls einen zweiten postovulatorischen Östradiolanstieg etwa 5 bis 6 Tage nach der Brunst und das bei allen Versuchstieren, ob sie nun konzipierten oder nicht. Die Verfasser begründen dies auf der Basis der Ausführungen von Short et al. (1979) mit den zu diesem Zeitpunkt für ein effektives, hypothalamisches Feedback noch zu niedrigen Progesteronkonzentrationen, welche aber durchaus die Ovulation hemmen. Kommt es bei dem ersten, Östrusbedingten Maximum von Östradiol-17 β nicht zur Ovulation, so ergeben sich in Folge auch keine steigenden Progesteronkonzentrationen und der zweite Östrogenan-

stieg nach 7 Tagen könnte erneut eine Ovulation einleiten (Glencross und Pope 1981).

Daß diese Interöstrusfollikel existieren, beweisen die Arbeiten von Rajakowsky (1960), die endoskopisch-analytischen Untersuchungen von Schams et al. (1974) und die klinisch-hormonanalytischen Arbeiten von Schneebeli und Döbeli (1984), die die Resultate von Glencross und Pope (1981) bestätigen.

Ein direkter luteotroper Effekt von Östradiol-17 β scheint ausgeschlossen, da es die LH-induzierte Progesteronsekretion bei bovinen Zellkulturen hemmt (Williams und Marsh 1978). Nicht auszuschließen jedoch ist eine Signalwirkung von Östradiol-17 β embryonalen Ursprungs auf indirektem Wege z.B. durch eine Veränderung der Blutstromverhältnisse von Uterus und Ovar während der frühen Gravidität (Ford und Chenault 1981).

1.4. Thrombozyten als Indikator der frühen Trächtigkeit

1842 entdeckte Donne als erster "die kleinen Kügelchen im Blut" und nannte sie "Globuline". In den folgenden Jahrzehnten immer wieder im Blickpunkt weiterer Forschungen, wurde ihre Abstammung von den Megakaryozyten des Knochenmarks von Wright (1906) beschrieben. Die maßgebliche Beteiligung an der Blutgerinnung und Retraktion wurde zuerst von Hayem (1878) erfaßt, Dekhuyzen nannte sie nach ihrer Hauptfunktion "Thrombozyten" (1901). Bei Untersuchungen über die Morphologie und Struktur der Thrombozyten stellten Fantl und Ward (1956) fest, daß Erythrozyten im Volumen ca. achtmal größer sind als Thrombozyten. Die im Inneren der Thrombozyten beobachteten Granula enthalten neben Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin vor allem auch den Blutgerinnungsfaktor III, der maßgeblich an der Thrombokinasenbildung beteiligt ist (Schulz et al. 1958). Die sich von Zellfortsätzen der Knochenmarksriesenzellen (Megakaryozyten) abschnürenden Thrombozyten des Rindes haben eine im Vergleich zu den Erythrozyten und Granulozyten nur geringe Lebensdauer von etwa 10 Tagen (Mizuno et al. 1958). Der Abbau der Blutplättchen erfolgt in den Zellen des retikuloendothelialen Systems, vor allem in der Milz sowie in geringem Ausmaß in Leber,

Lunge und Knochenmark (Müller und Weinreich 1956). Die zentrale Stellung im Steuerungsprozeß der Thrombozyten nimmt jedoch die Milz ein (Hittmair 1956). Die Steuerung der Thrombozytenzahlen erfolgt wohl über neurale, humorale und hormonelle Signale (Komiya 1965).

Neben der Funktion bei der Blutstillung werden den Thrombozyten auch immunologische Aufgaben zugeschrieben. So sind die Blutplättchen zur Virusphagozytose befähigt (Schulz und Landgräber 1966). Möglicherweise läßt sich dadurch auch die Verminderung der Thrombozytenzahlen im Anfangsstadium einer Infektion erklären. Als Folge kommt es dann in der Rekonvaleszenz mit einer gewissen Verzögerung zu einer deutlichen Thrombozytose, da der Organismus die verbrauchten Blutplättchen durch eine vermehrte Bildung von Megakaryozyten im Knochenmark ersetzt (Roskam 1969).

Die vielen Faktoren, welche die ohnehin schon großen physiologischen Schwankungen unterworfenen Thrombozytenzahlen beeinflussen, waren in vergangener Zeit immer wieder Anlaß zu eingehenden Untersuchungen.

So kommt es beim Menschen während der Schwangerschaft zu einem Rückgang und im Puerperium zu einem Anstieg der Plättchenzahlen (Franke und Horwitz 1932). Körperliche Anstrengungen, Erschöpfungszustände und psychische Streßsituationen haben ebenfalls Auswirkungen auf die Zahl der Thrombozyten (Heilmeyer 1951). Nach Kraft und Dürr (1981) kann eine Thrombozytopenie Begleitsymptom einer Vielzahl von pathologischen Zuständen sein. In diesem Zusammenhang seien vor allem Thrombozytopenien genannt, die Ausdruck einer gestörten Thrombozytopoese im Knochenmark sind. Infektiöse Erkrankungen, Stoffwechselstörungen und Komplikationen nach Medikament verabreichungen, wie z.B. auch nach Östrogengaben, werden hier genannt. Die Autoren erwähnen auch die Verbrauchskoagulopathie oder disseminierte intravasale Gerinnung als nicht zu unterschätzende Ursache einer Thrombozytopenie, jedoch nicht im Sinne einer Erkrankung sui generis sondern als sekundäre Erscheinung anderer pathologischer Umstände. Hogger (1986) beobachtet ein Absinken der Thrombozytenzahlen beim Rind nach erfolgter Luteolyseinduktion mit PGF_{2α}, was bei einer natürlichen Luteolyse

nicht feststellbar war, kann aber über eine direkte Wirkung des Medikaments nichts aussagen.

Um die Thrombozytenanzahl im Plasma zu ermitteln stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung (Stöhr 1983). Die eine ist die direkte Methode, bei der die Blutplättchen nach Stabilisierung in einem erythrozyten- und leukozytenfreien Medium in der Zählkammer an Hand eines Phasenkontrastmikroskops ausgezählt werden. Die andere Technik wird durch die automatischen Zählverfahren (z.B. Coulter-Prinzip) dargestellt. Sie bestechen vor allem durch den geringen Zeitaufwand und die große Präzision (Hoeffler und Oette 1974).

Wie bei jedem Nachweisverfahren treten auch bei der Thrombozytenzählung Fehlerquellen auf, die aber in erster Linie auf Blutentnahme, Konservierung und Aufbereitung zurückzuführen sind (Stöhr 1983). So berichtet der Verfasser bei seinen Untersuchungen mit Pferdeblut (EDTA) von einem Rückgang der Thrombozytenzahlen in der Zeit von der Blutentnahme bis zur Auszählung um maximal 8%, wenn obige Zeitspanne nicht größer als 4 Stunden ist. Weisberg (1973) hingegen kommt unter vergleichbaren Bedingungen beim Menschen zu um 25% geringeren Thrombozytenzahlen 3 Stunden nach Blutprobenentnahme.

Hogger (1986) sieht gegenüber EDTA entscheidende Vorteile in der Heparinkonservierung (NH₄-Heparin), da diese Art der Gerinnungshemmung selbst nach 3 Stunden noch relativ stabile Werte verspricht. Er empfiehlt, um Zeiteinflüsse auszuschließen, eine Auszählung der Blutplättchen innerhalb 2 Stunden nach Probenentnahme.

Eine Auswirkung von Rasse und Alter der Versuchstiere konnte zumindest beim Rind nicht festgestellt werden, es wird jedoch davon unabhängig von einer großen, auch individuellen Varianz der Thrombozytenzahlen berichtet (Hogger 1986).

Im Verlauf eines Zyklus ergibt sich bei Untersuchungen mit EDTA-Blut beim nichtgraviden Rind eine deutlich erkennbare, relative Absenkung der Plättchenzahlen an den Zyklustagen 8 bzw. 15 und einer noch ausgeprägteren Thrombozytopenie während der Brunst

(Rota und Christofori 1975). Die Autoren sehen, bezugnehmend auf die Arbeiten von Glencross und Pope (1973), diese Resultate mit den jeweils an den obigen Tagen ansteigenden Konzentrationen von Östradiol-17 β im peripheren Blut begründet. Sie berichten zusätzlich von einer Thrombozytopenie 24 Stunden nach Applikation von Östrogen und einer Thrombozytose 36 Stunden nach Gabe von Progesteron. Die Zahlen der Blutplättchen stabilisierten sich in beiden Fällen erst nach 2 bis 4 Tagen wieder auf dem Durchschnittsniveau, welches allerdings sehr streut.

In Verbindung mit einer Gravidität ergibt sich bei der Maus im frühen Trächtigkeitsstadium der ersten 7 Tage nach der Befruchtung eine signifikante Thrombozytopenie, die bei nicht erfolgter Fertilisation fehlt (O'Neill 1985a). Der Verfasser postuliert diese Absenkung der Blutplättchenzahlen zumindest bei der Maus als Ausdruck des Erkennens der Gravidität vor der Implantation seitens des maternalen Organismus. Dieses Geschehen ist ausschließlich an das Vorhandensein von fertilisierten Oozyten gebunden und positiv korreliert mit der Anzahl der Embryonen. Er kommt in diesem Zusammenhang bei seinen Untersuchungen zu dem Schluß, daß die Milz gravider Tiere in den ersten 5 Tagen nach Fertilisation vermehrt Thrombozyten ins Blut abgibt. Der Autor vermutet die Ursachen der veränderten Gewichtsverhältnisse der Milz in einem östrogenen Einfluß und bestätigt damit Sasaki und Ito (1981).

Der Verfasser schließt auf einen vom Embryo gesteuerten Mechanismus, der den mütterlichen Organismus quasi als Antwort auf die Anwesenheit eines Konzeptus in der präimplantiven Phase zu einem erhöhten Verbrauch von Thrombozyten veranlaßt ohne jedoch dabei die Blutgerinnungszeit zu verlängern. Der Blutgerinnungsfaktor III muß also bei den frühgraviden Mäusen sehr viel schneller freigesetzt werden als bei den nichtgraviden, was auf die Produktion eines die Thrombozyten aktivierenden Faktors durch die Embryonen zurückgeführt wird (Chignard et al. 1979, O'Neill 1985b).

Erste grobe Untersuchungen bei frühgraviden Rindern durch Hogger (1986) ergaben ebenfalls eine Absenkung der Thrombozytenzahlen um 18.5% an den Graviditätstagen 1 bis 5, die der Verfasser aber auf Grund der großen Schwankungen lediglich als Hinweis auf eine Erkennung der Frühgravidität seitens des mütterlichen Organismus gewertet wissen möchte.

2. Versuchsplanung und -Durchführung

2.1. Problemstellung und Versuchsplanung

Auf dem Gebiet der Biotechnik wird nun schon seit vielen Jahren der Embryotransfer beim Rind mit vorausgegangener Superovulation kommerziell durchgeführt. Die grundsätzliche Überprüfung biotechnischer Rezepte zur Beeinflussung des Ovars und seiner Funktionsgebilde im Sinne von Superovulation und Luteolyseinduktion und die Erprobung einer neuen Technik zur Follikelstimulation durch Verabreichung von FSH über osmotische Minipumpen im Vergleich zur herkömmlichen Methode der Injektion des Gonadotropins stellen das Leitmotiv dieser Arbeit dar.

Die physiologischen Vorgänge, die während der frühen Gravidität des Rindes vom mütterlichen Organismus wie auch vom Konzeptus ausgehend zur Erhaltung der Gravidität führen, sind noch weitgehend ungeklärt, basieren zum Teil nur auf in vitro Ansätzen oder sind gar nur hypothetisch formuliert.

Der Gedanke, eventuelle hormonelle Signale des Konzeptus könnten sich beim Vorliegen einer multiplen Frühgravidität in Form veränderter Sekretionsmuster der "Leitsteroid" Progesteron und Östradiol-17 β verstärkt und damit besser meßbar darstellen, war ein weiterer Aspekt der vorliegenden Dissertation. Insbesondere bei Östradiol-17 β liegt der Schluß nahe, der Trophoblast könne bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Gravidität (ab Tag 7) Signale an die maternalen Reproduktionsorgane entsenden (Schallenberger et al. 1986). So sollte die multiple Frühgravidität über den Zeitpunkt der üblichen Embryonenspülung (Graviditätstag 6 - 8) hinaus bis zum Tag 24 bestehen bleiben, um möglicherweise verstärkte hormonelle Signale auch nach dem Zeitpunkt der Implantation nachzuweisen.

In diesem Zusammenhang deutet sich die Möglichkeit an, der maternale Organismus reagiere bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt auf das Vorliegen eines Befruchtungsprodukts mit veränderten Thrombozytenzahlen (O'Neill 1985a). Eine Methode zur Bestimmung

von Blutplättchen sollte unter Praxisbedingungen bei der Spezies Rind erprobt werden.

Bevor Neuerungen allgemeine Anwendung finden, sollten sie ausreichend erprobt werden. Es sei auch erwähnt, daß der Mensch in seinem Bestreben der Ertragsoptimierung immer mehr geneigt ist, in physiologische Abläufe einzugreifen. Er soll und muß erkennen, in wie weit er entweder physiologische Abläufe zu simulieren im Stande ist oder aber zumindest pathologische Prozesse vermeiden kann.

Um die basale Hormonsekretion während verschiedener Reproduktionsstadien beim Rind möglichst lückenlos zu dokumentieren bedarf es eines hohen materiellen und personellen Aufwandes.

Aus obigen Zusammenhängen heraus ergaben sich in den unter 2.2. und 2.3. beschriebenen Versuchen folgenden Schwerpunkte:

1. Studium der induzierten Luteolyse durch Injektion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei zyklischen Rindern
2. Studium der durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzierten Luteolyse nach vorhergehender Follikelstimulierung
3. Stimulierung von Follikeln zur Superovulation mit anschließender Brunst und künstlicher Besamung. Hier sollten zwei Behandlungsverfahren verglichen werden; Hormonprofile während der Phase der Follikelanbildung, Brunst und KB sollten dargestellt werden.
4. Das unter Punkt 3 beschriebene Verfahren sollte eine multiple Gravidität induzieren; diese sollte bis zum Tag 24 verfolgt werden.
5. Induktion einer Luteolyse bei frühgraviden Rindern durch Applikation eines Prostaglandinanalogs am Graviditätstag 24 (analog Punkt 1 und 2). Der Zeitpunkt des Aborts am Tag 24 der Gravidität wurde bewußt gewählt, um so mögliche spontane Luteolysen im Falle einer nicht erfolgten Fertilisation noch verfolgen zu können.

Dabei war vor allem von Interesse wie, und vor allen Dingen in welchem Zeitraum die Tiere ohne zusätzliche iatrogene Einflußnahme wieder in einen physiologischen Zyklus eintreten würden. Die Stadien 1 bis 5 sollten während eines Zeitraumes von knapp 3 Monaten durchlaufen werden.

6. Zudem sollten im Zuge der relativ frequenten Blutentnahmen die Thrombozytengesamtzahlen der graviden Tiere festgehalten werden, um auf diese Weise erste Daten zu erstellen.

2.2. Versuchsdurchführung

2.2.1. Tiermaterial

Alle nachfolgend beschriebenen Versuche fanden auf der Versuchstation "Veitshof" der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weißenstephan statt.

Die insgesamt 6 Versuchstiere setzten sich zusammen aus 4 Kalbinnen ("Flecki", "Rille", "Bruni", "Ronda") und 2 nicht laktierenden, nicht graviden Altkühen ("Nanni", "Rexe"). Das Alter der Tiere bewegte sich zwischen 20 Monaten und 7 Jahren, und mit Ausnahme der Kalbin "Flecki" (Deutsches Fleckvieh) gehörten die Versuchstiere alle der Rasse "Deutsches Braunvieh" an (Tab. 1). Sie wurden zu jeweils zwei Tieren ("Flecki"/"Nanni", "Rille"/"Bruni", "Ronda"/"Rexe") in Boxenlaufställen auf Spaltenböden gehalten und bekamen Altheu, Maissilage, Graspellets, Getreideschrot und ca. 3 Wochen nach Versuchsbeginn gehäckselten Frischmais zugeteilt. Bei der tierärztlichen Eingangsuntersuchung wurden mit Ausnahme bei der Kuh "Nanni", welche hinten beidseits an einem mittelgradigen bis schweren Rusterholz'schen Sohlengeschwür litt, bei keinem der Tiere klinisch-pathologische Veränderungen festgestellt.

Tab. 1 Übersicht über die in den Versuchen eingesetzten Versuchstiere

Versuchstier	Rasse	Alter bei Versuchsbeginn	Kanul. Gefäß	Katheterlänge (cm)	Stimulationsverfahren (Menge FSH)	Reaktion auf SO - Stimulation
"Flecki" (Kalbin) Fl	FV	20 Monate	AO VC	65 65	FSH-Pumpe 42.5 mg	ca. 5 c.l. (Tag 15) -45 ng/ml
"Nanni" (Altkuh) Na	BV	7 Jahre	VJUG	40	FSH-Pumpe 42.5 mg	ca. 6 c.l. (Tag 16) -20 ng/ml
"Rille" (Kalbin) Ri	BV	27 Monate	VC	75	FSH-Pumpe 40 mg	> 10 c.l. (Tag 16) -900 ng/ml
"Bruni" (Kalbin) Br	BV	29 Monate	VJUG	40	FSH-Injekt. 40 mg	> 10 c.l. (Tag 16) -300 ng/ml
"Ronda" (Kalbin) Ro	BV	30 Monate	AO VC	70 65	FSH-Injekt. 40 mg	ca. 4 c.l. (Tag 15) -100 ng/ml
"Rexe" (Altkuh) Re	BV	3 Jahre	VJUG	40	FSH-Injekt. 40 mg	ca. 4 c.l. (Tag 15) -35 ng/ml

FV Deutsches Fleckvieh
 BV Deutsches Braunvieh
 AO Aorta abdominalis
 VC Vena cava caudalis
 VJUG Vena jugularis externa
 c.l. Corpora lutea
 ng/ml Konzentration Progesteron im ml Blutplasma
 SO Superovulation

2.2.2. Zeitplan der Manipulationen

Um den versuchstechnischen Ablauf so reibungslos wie möglich zu gestalten, war es notwendig, vom Zyklusstand der jeweiligen Einzeltiere genaue Kenntnis zu haben. Aus diesem Grunde wurden über den Zeitraum von ca. 6 - 8 Wochen vor Versuchsbeginn eine intensive Brunstbeobachtung durchgeführt sowie die früheren Brunstdaten gesammelt.

Zusätzlich wurden zur objektiveren Zykluskontrolle etwa 3 Wochen vor Versuchsbeginn im dreitägigen Turnus Blutproben durch Punktion der Vena jugularis gewonnen und im Labor anhand des Radioimmuntests auf ihren Progesterongehalt untersucht. Bei einer Progesteronkonzentration $> 3 \text{ ng/ml}$ Blutplasma wurde einem Teil der Tiere ein Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Analog (Estrumate[®], 2 ml = 500 µg, i.m.) mit dem Ziel der Luteolyseinduktion injiziert. Zum Teil wurde die Injektion nach 9, 10 bzw. 11 Tagen wiederholt. Auf diese Art und Weise wurde erreicht, daß sich bei Beginn des Versuchs alle 6 Versuchstiere synchron in der Lutealphase befanden.

1 bzw. 2 Tage vor dem Beginn der Blutprobenentnahme wurden den Tieren mit Ausnahme der Kalbin "Rille", bei der es gelang, einen aus vorangegangenen Versuchen subcutan liegenden Vena cava-Katheter zu reaktivieren, die Dauerkatheter in die jeweiligen Gefäße implantiert (Tab.1).

Die Versuchsanordnung und -dauer erforderten es, die Tiere auf Grund des erhöhten Infektionsrisikos permanent zu überwachen. Dies geschah durch Adspektion von Verhalten und Allgemeinzustand, Messen der inneren Körpertemperatur und Feststellen des Hämatokritwerts mindestens einmal täglich. All diese Beobachtungen wurden im Verlauf des ganzen Versuchs detailliert protokolliert.

Frequenz der Blutentnahmen:

1. Die Tiere wurden durch die 2-malige Applikation eines Prostaglandinanalogs i.m. (Estrumate[®], 2ml = 500µg) im Abstand von 12 Stunden an den Zyklustagen 8-11 (Fl 8, Na 11, Ri 8, Br 9, Ro 11, Re 11) zyklussynchronisiert. Daß sich die Versuchstiere zu

diesem Zeitpunkt in der mittleren Lutealphase befanden, war durch die bereits beschriebenen Vorbereitungen gewährleistet.

Blutprobenentnahmefrequenz: Die ersten zwei Tage des Versuchs wurden je morgens und abends eine Probe gezogen, dann durchgehend alle 2 Stunden, beginnend zwischen 12 (Na, Ro, Re), 24 (Br), bzw. 36 (Fl, Ri) Stunden vor der 1. PGF_{2α}-Injektion und endend 120 (Na, Ro, Re), 108 (Br), bzw. 96 (Fl, Ri) Stunden nach derselben.

Der Zeitraum im Anschluß bis zum nächsten Abschnitt wurde durch 6-malige Blutentnahmen täglich im Abstand von 2 Stunden dargestellt.

2. Stimulierung der Tiere zur Superovulation mit porcinem FSH über den Zeitraum von 4 Tagen unter paralleler Erprobung zweier Stimulationstechniken (Alzet osmotische Minipumpe versus Injektion).

Die Gesamtstimulationsdauer betrug in beiden Fällen 4 Tage, die zur Stimulation verwendete FSH-Menge sollte im Falle der Minipumpen maximal 50 mg, im Falle der Injektion exakt 40 mg betragen. Die Tiere befanden sich zum Zeitpunkt des Stimulationsbeginns in den Zyklustagen 7 (Na), 9 (Ri, Ro, Re) und 10 (Fl, Br).

Es wurden 2 Gruppen zu je 3 Tieren gebildet:

- a) SO-Stimulation durch Minipumpen: "Flecki", "Nanni", "Rille"
Verweildauer der Minipumpen: 4 Tage (96 Stunden)
Durchschnittlich abgegebene FSH-Menge: 1.7ml = 42.5mg FSH

- b) SO-Stimulation durch Injektion : "Bruni", "Ronda", "Rexe"
8 Injektionen s.c. im Abstand von 12 Stunden in abnehmenden Dosierungen (mg FSH):

6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5 mg - Gesamtmenge 40 mg FSH
1.3, 1.2, 1.1, 1.0, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7 ml - Gesamtmenge 8 ml Lösung

Die Blutprobennahme während dieses Versuchsabschnitts wurde über den Zeitraum von 9 Tagen durchgehend im Abstand von 2 Stunden durchgeführt, beginnend 12 Stunden vor SO-Stimulationsanfang und endend 108 Stunden nach Stimulationsende.

3. Luteolyseinduktion zur Superovulation durch 2-malige Applikation von je 500 µg Cloprostenol i.m. (Estrumate[®], 2 ml) im Abstand von 12 Stunden. Beide Tiergruppen (Minipumpen wie auch Injektion) erhielten die erste Prostaglandininjektion 72, die zweite 84 Stunden nach Stimulationsbeginn. Bei der Tiergruppe "FSH-Injektion" fielen die zwei Prostaglandin-Applikationen mit den letzten beiden FSH-Injektionen zeitlich zusammen.

Frequenz der Blutprobengewinnung siehe Versuchsabschnitt 2.

4. Zweimalige Künstliche Besamung (KB) aller Tiere 60 bzw. 72 Stunden nach der 1. Prostaglandininjektion unabhängig vom Auftreten äußerer Brunstsymptome.

Zusätzlich wurde der Erfolg der SO-Stimulation 2 Wochen später durch rektale Palpation der vorhandenen Corpora lutea auf den Ovarien sowie durch eine diagnostische Laparatomie der Tiere "Nanni" und "Rille" dokumentiert (2.2.7. und 2.2.6.).

Frequenz der Blutprobenentnahme siehe Versuchsabschnitt 2.

Ende des durchgehend 2-stündigen Probenentnahmerhythmus' 48 Stunden nach der 2.KB, anschließend wurden die Blutproben über den Zeitraum von 13 Tagen nur noch 6mal tagsüber im 2-stündigen Intervall gezogen bis zum Frühgraviditätstag 15 (Fl, Ro, Re) bzw. 16 (Na, Ri, Br). Danach begann wieder ein Entnahmerythmus durchgehend alle 2 Stunden.

5. Abbruch der vorliegenden multiplen Gravidität durch Luteolyseinduktion an den Tagen 24 (Fl, Re) bzw. 25 (Na, Ri, Br). Dieser artifizielle Abort wurde induziert durch eine 2-malige Injektion von 500 µg Cloprostenol i.m. im Abstand von 12 Stunden. Synchron mit der durchgehend 2-stündigen Blutprobenentnahme erfolgte eine intensive Brunstbeobachtung. Die 2stündige

Blutentnahme dauerte vom Tag 17 der Gravidität bis 120 Stunden nach der 1. Applikation des Prostaglandinanalogs in diesem Versuchsteil.

6. Dokumentation der auf den Abbruch der Mehrlingsgravidität folgenden Brunstdaten. Die Versuchstiere wurden ab diesem Zeitpunkt keiner hormonellen Manipulation mehr ausgesetzt, es erfolgte lediglich eine äußerst intensive Brunstbeobachtung.

Die Blutprobenentnahmehäufigkeit beschränkte sich in diesem Abschnitt des Versuchs für die Dauer von 19 Tagen auf je morgens und abends eine Probe und im Anschluß daran 5 Tage lang eine Blutprobe täglich.

Die Gesamtdauer des Versuchs betrug 77 Tage. Ein Tag nach Versuchsende wurden bei allen Tieren die Dauerkatheter gezogen, damit die Rinder nach ca. 2-3 Wochen der Schlachtung zugeführt werden konnten. Dabei wurden die Ovarien gesammelt und einer histologischen Untersuchung zugeführt.

2.2.3. Operation und Implantation der Dauerkatheter

Wie bereits im Abschnitt 2 des Kapitels "Versuchsdurchführung" (2.2.) angedeutet, wurden den Versuchstieren mit einer Ausnahme ("Rille") die Dauerkatheter operativ implantiert. Da sich gemäß Planung die Versuchsdauer über 11 Wochen unterschiedlicher Probenentnahmeintensität erstrecken sollte, war es über die chirurgische Kunst hinaus besonders notwendig, unter sterilen Bedingungen zu arbeiten, um eine überschießende Granulation und Thrombenbildung zu vermeiden.

Trotz aller Bestrebungen, Katheterausfälle zu verhindern, waren solche zu verzeichnen. So war es während des Versuchs mehrfach notwendig, einzelne Tiere nachzuoperieren oder zumindest die noch liegenden, nicht mehr durchgängigen Katheter zu reaktivieren, was zusätzlich beträchtliche Zeit in Anspruch nahm.

In diesem Zusammenhang mußten die Tiere "Flecki" (VC) und "Rexe" (VJU) einmal, "Nanni" (VJU) zweimal und "Bruni" (VJU) dreimal nachoperiert werden, was erkennen läßt, daß die Dauerkatheter in der Vena jugularis externa mehr Probleme bereiteten als jene in den zentralen Körpergefäßen.

Implantation der Vena-cava-caudalis-bzw. Aorta-abdominalis-Katheter

Nach gründlichem Bürsten, Waschen und Scheren des Schwanzes und der Kruppe der Tiere wurde unter bestmöglichen aseptischen Kaute-len am sedierten (4.5-5.0 ml Combelen[®] oder 1.5-2.0 ml Rompun[®] i.m.) und lokalanästhesierten Tier (3-5 ml Hostacain[®] 2 %, epidu-ral) nach der von Walters und Schallenger (1982) und Walters, Schams und Schallenger (1984) beschriebenen Methode vorgegan-gen.

Zwischen dem 5. und 6. Schwanzwirbelsegment wurde an der Ventral-seite des Schwanzes die Haut mit einem ca. 5 cm langen Schnitt eröffnet, die Arteria und Vena caudalis mediana dargestellt, in-zisiert und je ein steriler, silikonisierter Polyvinyl-Katheter (Innendurchmesser 1 mm, Außendurchmesser 2 mm) etwa 65-75 cm, ab-hängig von der Größe des Tieres, in die Gefäße eingeführt. Er-wünscht war dabei, daß die Katheterspitzen gerade cranial der Einmündungsstellen der Venae und Arteriae ovaricae zu liegen kom-men, um einen möglichst großen Anteil der Blutdrainage sowie der Blutzufuhr des Ovars zu erfassen.

Alle Tiere erhielten als postoperative Medikation dreimal im täg-lichen Abstand Gentamycin in prophylaktischer Dosis (Friesogent[®], Coopers, 30-40 ml s.c.) und durchliefen eine komplikationslose postoperative Phase ohne Temperaturerhöhung und Auftreten klini-scher Krankheitssymptome.

Implantation der Vena-jugularis-externa-Katheter

Hierbei handelt es sich um eine Implantationsmethode, die in An-lehnung an die bereits angeführte Operationstechnik von Walters und Schallenger (1982) für diesen Versuch neuentwickelt und den anatomischen Verhältnissen am Hals des Rindes angepaßt wurde.

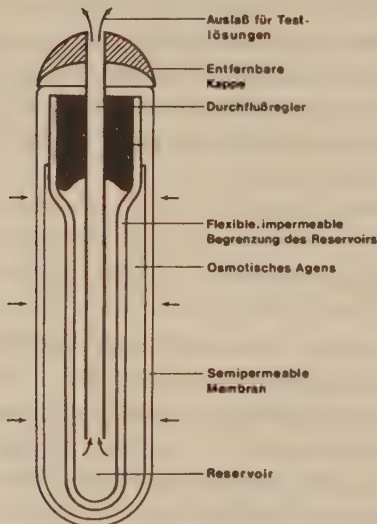
Die Tiere wurden vor dem operativen Eingriff ausreichend fixiert, sediert (Combelen[®] 4.5-5.0 ml, i.m.) und mit einer lokalen Infiltrationsanästhesie versehen (Hostacain[®] 2%, 10-15 ml, s.c.). Nach gründlichem Bürsten, Waschen, Scheren und Desinfizieren des Operationsfeldes am Halse und Widerrist des Tieres wurde die Vena jugularis externa, die in diesem Bereich unmittelbar subkutan verläuft, gestaut. Unter streng sterilen Kautelen wurde die Haut durch einen ca. 5 cm langen Schnitt eröffnet und nach Mobilisation des subkutanen Bindegewebes mittels einer stumpfen Schere das Gefäß freigelegt. Die Vena jugularis externa wurde nun mit einer großlumigen (Innendurchmesser 2.5-3.0 mm), kurzen Kanüle punktiert und der in 10cm-Schritten markierte Polyvinyl- oder Silastikkatheter mit dem venösen Blutstrom zwischen 25 und 30 cm Richtung Truncus cephalicus vorgeschoben. Nach Entfernen des Staus und Ausführen der Kanüle fixierten wir den Katheter mit einer Schleife subkutan, kontrollierten den Blutrückfluß, spülten den Katheter mit Heparinlösung und schoben ihn dann anhand eines stumpfen Dornes subkutan in Richtung Widerrist des Tieres, wo er dann durch eine ca. 0.5 cm lange Hautinzision hervortrat, mit einem Ansatzkonus versehen und in einem Ledertäschchen, was durch Hauthefte fixiert war, verwahrt wurde. Die Operationswunde wurde durch eine Subkutan- und Hautnaht verschlossen und die Patienten mit der schon erwähnten postoperativen Antibiose versehen. Auf diese Weise wurde es möglich, peripheres, venöses Blut über einen längeren Versuchszeitraum zu gewinnen ohne daß sich dabei die große Beweglichkeit des Versuchstieres im Hals-Kopfbereich störend auf die Blutprobenentnahme auswirkte.

2.2.4. Füllen der FSH-Pumpen sowie FSH-Rückgewinnung

Wie schon erwähnt, wurde die eine Versuchstiergruppe (Fl, Na, Ri) durch die kontinuierliche Applikation von FSH über implantierte Minipumpen (Alzet osmotic pump, Model 2ML) zur Superovulation stimuliert. Um eine Vergleichbarkeit der beiden Stimulationsverfahren zu gewährleisten, war es notwendig, neben der gleichen Applikationsart und Applikationsdauer (s.c. über 4 Tage in beiden Fällen) die selbe Menge des gleichen Hormons (F.S.H.-p., Burns-Biotec) zu verwenden. Hierzu standen in lyophilisierter Form 50mg

des schweinehypophysären FSH sowie jeweils 10 ml 0,9%ige Natriumchloridlösung als Lösungsmittel in Durchstechampullen vom Hersteller zur Verfügung. Nachdem das im Versuch verwendete Modell der Minipumpe laut Hersteller eine Maximalkapazität von 2.1ml besaß, wurden die 50 mg FSH in je 2 ml des zugehörigen Lösungsmittels aufgenommen, vorsichtig, unter Vermeiden von Adhäsionsrückständen in Tuberkulinspritzen (Ersta, Asik) aufgezogen und langsam, der Luft im Pumpenreservoir (siehe Abb.1) Zeit zum Entweichen gebend, mittels einer kurzen, stumpfen Kanüle in die Minipumpen verbracht. Anschließend war dann nur noch die entfernbare Kappe mit dem Durchflußregler auf die Minipumpe aufzusetzen und das System war einsatzbereit. Das Herstellen der Lösung und Füllen der Pumpen geschah unmittelbar vor der Implantation, um so äußere Zersetzungseinflüsse möglichst auszuschalten. Zudem wurde dabei streng auf eine möglichst aseptische Vorgehensweise geachtet, um eine die Medikamentenresorption störende, eventuelle Gewebsüberreaktion auszuschließen.

Abb. 1 Schematische Darstellung der Alzet osmotischen Minipumpe



Osmotische Minipumpe Alzet® 2002 Alza Corp., Palo Alto, Calif., USA

Nach der Verweildauer von 4 Tagen im subkutanen Bindegewebe der 3 Versuchstiere (Fl, Na, Ri) wurden die Minipumpen wieder vorsichtig, unter Vermeidung von Beschädigungen, entnommen. Um die jeweils nicht abgegebene FSH - Menge zu bestimmen, wurde die Kappe mit dem Durchflußregler abgenommen und dann die im Reservoir verbliebene Flüssigkeit mit den Tuberkulinspritzen zurückgewonnen.

Bei einer Konzentration von 25 mg/ml ergaben sich folgende Werte:

"Flecki"	0.3 ml	zurückgewonnene FSH-Lösung		=	7.5 mg FSH
"Nanni"	0.3 ml	- / -	- / -	=	7.5 mg FSH
"Rille"	0.4 ml	- / -	- / -	=	10.0 mg FSH

Daraus ist zu ersehen, daß die Tiere, ausgehend von einer ursprünglich eingesetzten Gesamtmenge von 50 mg, mit 42.5 mg (Fl, Na) bzw. 40.0 mg FSH (Ri) via Minipumpe stimuliert wurden.

2.2.5. Implantation und Wiederentnahme der FSH-Pumpen

Nach dem Füllen und Verschließen der Minipumpen wurden diese baldmöglichst den Versuchstieren implantiert. Als Implantationsort wurde das subkutane Bindegewebe lateral am Triel gewählt, da hier eine entzündliche Gewebsreaktion bzw. eine Abszeßbildung ohne Gefahr für das Leben des Tieres am besten zu kontrollieren war. Wichtig zu erwähnen ist, daß die osmotischen Minipumpen gemäß Hersteller mit einer Verzögerung von 4 Stunden post implantationem ihre kontinuierliche Medikamentenapplikation aufnehmen, was bei der Planung des Stimulationsbeginns berücksichtigt wurde.

Das Operationsfeld am sedierten (4.5-5.0 ml Combelen[®], i.m.) und gut fixierten Tier wurde nach den Regeln der Kunst geschoren, gewaschen, desinfiziert und mit einer lokalen Infiltrationsanästhesie (10-15 ml Hostacain[®] 2%, s.c.) versehen. Nach einer kleinen Inzision der Haut (4-5 cm) und stumpfen Mobilisation des darunter liegenden Bindegewebes war dann nur noch die funktionsbereite Pumpe, mit der Austrittsöffnung nach dorsal gerichtet, subkutan dort zu plazieren. Letztlich wurde die Operationswunde noch mit

2 Knopfnähten verschlossen und mit einer wundabdeckenden Zinklebertransalbe versehen.

Die Wiederentnahme der Minipumpen erfolgte analog zur Implantation, nur war jetzt vor dem Adaptieren der Wundränder auf eine kleine Wundrevision nach Friderichs zu achten. In allen drei Fällen heilten die Operationswunden per primam und es konnten die Fäden 8 Tage post operationem gezogen werden.

2.2.6. Diagnostische Laparatomie

Der Erfolg der SO-Stimulation wurde bei zwei Tieren (Na, Ri) durch eine diagnostische Laparatomie am Graviditätstag 19 dokumentiert. Gemäß der Wiener Methode (Arbeiter, 1978) wurde die Bauchhöhle am stehenden Tier von links lateral durch einen Flankenschnitt eröffnet und anschließend das ipsilaterale Ovar durch leichten Zug soweit als möglich in die Bauchwunde vorverlagert, adspiziert sowie fotografiert. Genauso wurde mit dem contralateralen Ovar verfahren, nur daß hier aufgrund der erschwerten anatomischen Verhältnisse ein Vorverlagern entfiel und man sich auf die Adspektion und Palpation in der Bauchhöhle unter Zuhilfenahme einer Lichtquelle beschränken mußte.

Als besonders demonstrativ erwies es sich, daß man nun die Gelegenheit hatte, die tatsächliche Anzahl der corpora lutea auf den Ovarien der beiden Patienten zu zählen was demzufolge auch einen Rückschluß auf die Zahl der vermutlich ovulierten Follikel zuließ.

So kam man zu folgenden Befunden:

"Rille"	linkes Ovar	19 c.l.	rechtes Ovar	14-15 c.l.
"Nanni"	linkes Ovar	5 c.l.	rechtes Ovar	1-2 c.l.

Als klinische Besonderheit muß angemerkt werden, daß es bei dem Tier "Nanni" während des Vorverlagerns des linken Eierstockes in die Operationswunde durch den leichten Zug am Mesovar zu einem vermutlich reflektorisch bedingten, perakuten, vasodilatatori-

schen Schock mit Festliegen und Atemnot kam. Die sofort eingeleitete Schocktherapie (15 ml Dexamethason i.v., 1500 ml physiol. Kochsalzlösung i.v.) erwies sich für den Patienten als erfolgreich. Auf Grund der nicht unerheblichen Rupturen an den Aufhängebändern des betroffenen Eierstockes entschlossen wir uns zur Ovariectomie. Anschließend verschlossen wir die Operationswunde wie von Arbeiter (1978) beschrieben.

Beide Patienten durchliefen eine komplikationslose postoperative Phase unter Antibiotikashutz (20 ml Tardomyocel®, i.m.) und konnten unmittelbar nach der Operation den anderen Versuchstieren zugeführt werden. Die Fäden wurden 10 Tage post operationem gezogen, es war in beiden Fällen eine Heilung per primam zu verzeichnen.

2.2.7. Rektale Palpation

Bei den 4 anderen Tieren wurde die Reaktion auf die Superovulationsstimulation nur durch rektale Palpation der corpora lutea auf den Ovarien kontrolliert, wohl wissend, daß diese Art der Erfolgskontrolle nur eine grobe Tendenz darstellen konnte und somit auch lediglich eine einfache Unterteilung in gute, bzw. sehr gute und mäßige bzw. schlechte Reagenten zuließ (siehe Tab.2).

Die rektale Palpation wurde bei allen Tieren an dem selben Tag (Tag 15 nach KB, also in der Blüthephase der Gelbkörper), annähernd zur gleichen Zeit von zwei mit dieser Untersuchungsmethode vertrauten Personen durchgeführt. Dabei wurde lediglich Wert gelegt auf die beiden Kriterien: Ungefähre Anzahl der corpora lutea auf beiden Ovarien und Uteruston.

Eine besondere Erwähnung verdient in diesem Zusammenhang der Zeitpunkt der rektalen Untersuchung:

Es sollten in keinem Falle rektale Kontrollen und Manipulationen am Ovar vor und während der Brunst vorgenommen werden, da zu der Zeit die große Gefahr des Springens der Graaf'schen Follikel besteht und die Möglichkeit des Abgleitens der Bursa ovarica von

dem auf ein Vielfaches seiner ursprünglichen Größe angewachsenen Eierstocks nicht ausgeschlossen werden kann.

Tab. 2 Ergebnisse der rektalen Palpation am Tag 15 nach KB

Tier	Anzahl der c.l. auf beiden Ovarien	Uteruston	Ovarreaktion auf SO
"Flecki"	5	-	mäßig
"Nanni"	6	-	mäßig
"Rille"	>10	-	sehr gut
"Bruni"	>10	-	sehr gut
"Ronda"	4	-	schlecht
"Rexe"	4	-	schlecht

2.2.8. Blutprobenentnahme und -Konservierung

Um eine Blutgerinnung in den Dauerkathetern zu verhindern, wurden nach jeder Entnahme (10 ml) die Katheter mit 3-5 ml Heparin-Lösung gespült (Konzentration 200 I.E. Rohheparin/ml phys. NaCl bei frequenten Entnahmen, 500 I.E. Rohheparin/ml phys. NaCl bei Entnahmepausen von mehr als 2 Stunden und schlecht laufenden Kathetern). Um eine bestmögliche Hygiene zu gewährleisten und Keimübertragungen von Tier zu Tier zu vermeiden, wurden für jeden Probanden separate Lösungen in 250ml-Flaschen verwendet. Nach jeder Entnahme wurden neue, sterile Einmalspritzen (10 ml, Pharma-Plast) verwendet, die Katheter und Ansatzstücke nach dem Probenziehen gereinigt und desinfiziert (Poly-Alkohol-Haut-Antiseptikum). Aus Gründen der Keimverschleppung wurden die Hände vor der Blutentnahme gewaschen, desinfiziert und durch Einmalhandschuhe geschützt.

Vor jeder Blutprobenentnahme war zuerst das in den Kathetern befindliche Heparin-Blut-Gemisch (ca. 2 ml) zu verwerfen. Im Anschluß daran wurde mit den 10ml-Einmalspritzen das Blut langsam, um Hämolyse zu vermeiden, aus den jeweiligen Kathetern gezogen, diese mit Heparinlösung gespült und unter Beachtung der bereits erwähnten Hygienemaßnahmen mit Verschlußknoten (Braun Melsungen)

verschlossen. Die Proben wurden vorsichtig in Polystyrolgranulat enthaltende, nicht beschichtete Blutentnahmeröhrchen (Sarstedt) übergeführt, durch mehrmaliges "Überkopfstürzen" (nicht schütteln) gemischt und unverzüglich in ein schmelzendes Eis-Wasser-Bad verbracht. Zur Vermeidung von Blutgerinnungsabläufen waren in die vorbereiteten Entnahmeröhrchen kurz vor der Probengewinnung jeweils 200 µl "Stabilisator" (siehe 2.5.3) vorgelegt worden. Anschließend wurden die Röhrchen mit einer Kühlzentrifuge (Sigma 4 K-1) bei 4°C und 4500 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang zentrifugiert, das so gewonnene Blutplasma vorsichtig mit Pasteurpipetten unter strikter Vermeidung von Schlierenbildung abgehebert, in je 2 Plasma-Aufbewahrungsröhrchen (Sarstedt) zu gleichen Teilen verbracht und bei -20°C bis zur späteren Analyse aufbewahrt.

2.3. Versuch "Thrombozytenzählung während der frühen Mehrlings-gravidität des Rindes"

Auf Grund des hohen zeitlichen und materiellen Aufwandes und eines personellen Engpasses konnte die Blutprobenentnahme zur Thrombozytenzählung, die zwar zeitlich parallel, jedoch organisatorisch separat zum Versuch "Superovulation-Frühgravidität" (SOEP) lief, mit wenigen Ausnahmen nur einmal täglich durchgeführt werden. Aus dem selben Grunde war es auch nicht möglich, daß die Blutentnahme sowie die Plasmaaufbereitung immer zur selben Tageszeit erfolgte. Die Zeitspanne zwischen Gewinnung des Plasmas und Thrombozytenzählung selbst war zeitlichen Schwankungen zwischen einer halben und zwei Stunden unterworfen. Hatte ein Versuchstier zwei Gefäße zur Auswahl (Aorta und Vena cava caudalis: "Flecki", "Ronda"), so wurde grundsätzlich dasjenige gewählt, welches "leichtgängiger" war.

Beginn der Blutprobenentnahme für Thrombozytenzählungen war einheitlich für alle Tiere der Tag der Besamung nach vorausgegangener Superovulation (Tag 0 der Gravidität) und Ende derselben zwei Wochen vor Abschluß des Gesamtversuchs.

2.3.1. Blutprobenentnahme und -Behandlung

Die für die Thrombozytenzählung bestimmten Blutproben wurden ebenso wie alle Proben des synchron laufenden Versuchs über die den Tieren implantierten Dauerkatheter gewonnen. Dabei war im Unterschied zu diesen streng darauf zu achten, daß die frisch gezogenen Blutproben nicht im schmelzenden Eisbad gekühlt, sondern bei Zimmertemperatur bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt wurden. In keinem Fall durften das Blut wie auch das Plasma in Glasröhrchen gefüllt werden, da sonst die Gefahr der Thrombozytenaktivierung und des Verlustes durch Adhäsion gegeben war.

Ansonsten waren sowohl das Volumen (10 ml), als auch die Menge des vorher zugesetzten Gerinnungshemmers (200 µl "Stabilisator") und die verwendeten Blutprobenröhrchen aus Kunststoff (Sarstedt) dieselben wie bei allen anderen Probengewinnungen auch.

2.3.2. Gewinnung von "platelet-rich-plasma" (PRP) und Herstellung der Zählflüssigkeit

Die derart vorbehandelten Blutproben wurden nun in einer nicht kühlenden Tischzentrifuge (Piccolo-Zentrifuge, Fa. Christ) bei Zimmertemperatur (ca. 25°C) für die Dauer von 5 Minuten mit der relativen Zentrifugalkraft von 90 g zentrifugiert. Diese 90 g waren aufgrund früherer Voruntersuchungen (Hogger 1986) notwendig, um das PRP (Plasmaüberstand) von störenden Erythrozyten zu befreien.

Von dem gewonnenen PRP wurden je 1 ml vorsichtig abgehebert und in ein Plasmaaufbewahrungsröhrchen aus Plastik (Sarstedt) verbracht. Anschließend pipettierte man davon je 10 µl in die Zählküvette (Coulter Electronics Ltd.), in der 20 ml Isoton II vorgelegt waren. Somit war eine Verdünnung von 1 : 2000 erreicht.

2.3.3. Zählmethodik

Zur Zählung der Thrombozyten wurde ein elektronisches Zellzählgerät (Coulter Counter Modell ZF) mit einer 70µm-Kapillare verwendet. In Anlehnung an die Diplomarbeit von Hogger (1986) wurden die Einstellwerte für die Kondensatorspannung ("Sensitivity"), den Gesamtwiderstand ("Controls") und den Amplitudendiskriminator ("Threshold") übernommen:

Sensitivity	.707
Controls	4
Threshold	4

Die Zählkapillare war vor jedem Abschalten des "Coulter Counter" in eine Zählküvette, welche mit einem reinigenden Detergens (Isoterge, pH 7.0, Coulter Electronics) gefüllt war, zu tauchen und dort bis zur nächsten Benutzung zu verwahren.

Nach jeder längeren Zählpause (> 1 Stunde), in der das Gerät nicht eingeschaltet war, mußte die Kapillare dann mit reinem Isoton II* (Hersteller: Coulter Electronics Ltd.) gespült und im

Anschluß daran der Leerwert in diesem Medium bestimmt werden. Er lag im Durchschnitt bei 446 Impulsen (141 Messungen) pro Zählvorgang. Leerwerte < 1000 Impulse blieben beim Test unberücksichtigt. Zudem galt bei jeder Zählung die Forderung, so staubfrei wie möglich zu arbeiten.

Der "Coulter Counter" mißt bei jeder Zählung 0.5 ml der vorbereiteten Thrombozytensuspension. Dies entspricht 0.25 μ l PRP, bei Doppelbestimmung 0.5 μ l. Nach Multiplikation mit dem Faktor 2 erhält man die Thrombozytenzahlen je μ l Plasma.

2.3.4. Validierung der Thrombozytenzählungen

Da die Thrombozytenzahlen nicht unerheblichen Schwankungen unterworfen sind, war es erforderlich, mögliche versuchstechnische Einflüsse auf die Ergebnisse auszutesten.

In diesem Zusammenhang wurden die Einflüsse folgender Parameter auf die Zählausbeute überprüft:

- Konservierungsart
- Art der Blutentnahme
- Tageszeit
- Zeitspanne zwischen Probengewinnung und Auswertung
- Temperatureinfluß
- Meßstreuungen des Geräts

Alle nachfolgend angegebenen Meßwerte beziehen sich auf die Zahl der Impulse pro Zählkuvette, also die Anzahl der Thrombozyten je 0.5 ml der Zählsuspension (2.3.3.).

1. Konservierungsart

Es wurden bei 3 Tieren zum selben Zeitpunkt je eine Doppelprobe (10 ml) gezogen und diese bei gleichen Bedingungen (Raumtemperatur, 90g, Katheterblut) unter Verwendung zweier Gerinnungshemmer (EDTA, NH_4 -Heparin) ausgezählt.

		"Nanni" (VJU)	"Rille" (VC)	"Rexe" (VJU)
EDTA (200 µl/10 ml)	1. Zählung	183726	188582	137893
	2. /	184655	188185	137063
NH ₄ -Heparin (beschichtet)	1. /	165094	179043	109610
	2. /	165507	179832	108308
"Nanni"	EDTA	184191	± 657	n = 2
	NH ₄ -Heparin	165301	± 292	/
"Rille"	EDTA	188384	± 281	/
	NH ₄ -Heparin	179438	± 558	/
"Rexe"	EDTA	137478	± 587	/
	NH ₄ -Heparin	108959	± 921	/

Wie aus obiger Aufstellung ersichtlich, ist eine abnehmende Tendenz in der Zählausbeute im Vergleich von EDTA zu NH₄-Heparin als gerinnungshemmendem Zusatz erkennbar. Die Abnahme bewegt sich zwischen 4.7% (Ri), 10.3% (Na) und 20.7% (Re).

2. Entnahmeart

Hierbei wurde bei einem der Versuchstiere zu demselben Zeitpunkt auf 3 verschiedene Arten Blut gewonnen, welches dann unter den Standardbedingungen (Raumtemp., 90g, 200 µl EDTA/10 ml) bis zur Zählung weiterbearbeitet wurde. Es sollten eventuelle Unterschiede zwischen Katheterentnahme und zwei Punktionsverfahren (Kanüle/Vacutainer) abgeklärt werden.

		Katheter	Vacutainer	Kanüle
"Bruni"	1. Zählung	142843	137302	166666
(VJU)	2. /	144312	137395	164979
Katheter		143578 ± 1039	n = 2	86.6 %
Vacutainer		137349 ± 66	/	82.8 %
Kanüle		165823 ± 1193	/	100 %

Es ist eine schwach abnehmende Tendenz von Kanüle über Katheter zum Vacutainer feststellbar (Kanüle = 100%, Katheter -13.4%, Vacutainer -17.2%).

Zusätzlich war es erforderlich eventuelle Unterschiede zwischen arteriellem und venösem Blut auszutesten. Deshalb wurden bei einem Tier mit zwei Kathetern ("Flecki", AO/VC) Vergleiche unter denselben Bedingungen (siehe oben) angestellt. Auch hier wurden die Proben zu demselben Zeitpunkt gezogen.

		Aorta abd.	Vena cava caud.
"Flecki"	1. Zählung	137407	95780
(EDTA)	2. /	138400	95117
Aorta		137904 ± 702	100 %
Vena cava		95449 ± 469	69.2 %

Dieser Einzelbefund deutet darauf hin, daß möglicherweise im arteriellen Blut erheblich mehr Thrombozyten nachweisbar sind als im venösen.

3. Tageszeit

Die Vermutung lag nahe, daß die Thrombozytenzahlen des Einzelindividuums wie andere physiologische Parameter (z.B. Körpertemperatur) tageszeitlichen Schwankungen unterliegen könnten. Aus diesem Grunde wurden bei 3 Tieren über den Tag verteilt im Abstand von 4 Stunden Blutproben via Katheter gewonnen (10 ml, EDTA, 90g,

Raumtemperatur), das PRP verdünnt (1 : 2000) und anschließend gezählt. Zusätzlich dazu sollte der jeweilige Hämatokritwert (Hkt.) mit einer hochoberigen Zentrifuge (Sigma 201 M, 12500 U./Min., 10 Min.) bestimmt werden.

Tageszeit	"Rille"	"Ronda"	"Rexe"
	1.Zähl./2.Zähl.	1.Zähl./2.Zähl.	1.Zähl./2.Zähl.
8 Uhr	151028/152564 Hct. 26 %	162891/164495 Hct. 25 %	112934/114077 Hct. 25 %
12 Uhr	161053/161453 Hct. 27 %	174835/174385 Hct. 26 %	112964/113050 Hct. 27 %
16 Uhr	151453/151071 Hct. 27 %	162302/161375 Hct. 26 %	108293/107752 Hct. 26 %
20 Uhr	159798/158043 Hct. 26 %	147508/148892 Hct. 26 %	113725/114847 Hct. 26 %
—			
x ± SD	155806 ± 4708	162085 ± 10053	112205 ± 2666
VK %	3.02 %	6.20 %	2.37 %
n	8	8	8

Der durchschnittliche Variationskoeffizient (VK) betrug demnach 3.9 ± 2.1 %.

Wie aus obiger Aufstellung ersichtlich, konnte bei einem mittleren Variationskoeffizienten von 3.9% und nahezu konstantem Hämatokrit eine tageszeitliche Schwankung der Thrombozytenzahlen ausgeschlossen werden.

4. Zeitspanne zwischen Probenentnahme und Thrombozytenzählung

Um diesen Einfluß auf die Auswertungen abzuklären, wurden bei 2 Tieren 6 Proben zum selben Zeitpunkt gezogen, dann eine definierte Zeit bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend unter

den üblichen Bedingungen (EDTA, 90g, Verd. 1:2000) bis zur Zählung weiterbehandelt.

Zeitspanne Proben- gewinnung bis Auswertung	"Rille"	"Rexe"
30 Min.	146536/148138	122615/123961
1 Std.	177775/177961	116558/117480
2 Std.	155655/155910	119836/119001
3 Std.	124735/125500	114875/115212
4 Std.	169162/170858	114845/114984
5 Std.	143032/144094	111276/111702
—		
x ± SD	153280 ± 18168	116862 ± 3925
VK %	11.9 %	3.4 %
n	12	12
VK - Mittelwert : 7.6%		

Ein Einfluß der Zeit auf die Auswertung konnte unter diesen Bedingungen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

5. Temperatureinfluß

Die Temperatur der zur Verarbeitung anstehenden Blutproben könnte die Thrombozytenzählergebnisse entscheidend beeinflussen, insbesondere wenn man bedenkt, daß sich allein schon die Viskosität des Plasmas durch Kühlung erhöht. Aus diesem Grunde wurden bei 2 Tieren je 3 Proben zum selben Zeitpunkt gezogen, bei 3 verschiedenen Temperaturen (0°C, 20°C, 37°C) 2 Stunden stehen gelassen und dann bis zur letztlichen Zählung wie gehabt (EDTA, 90g, Verd. 1:2000) weiterbehandelt.

Temperatur	"Rille"	"Ronda"
37°C	100% 174827	100% 161943
0°C	80% 140438	17% 27095
20°C	94% 164139	93% 150015
(Raumtemp.)		

Obige Übersicht bestätigt frühere Angaben einer starken Abnahme der Thrombozytenzahlen in gekühlten Proben.

6. Streuung des Meßgeräts

Nicht auszuschließen war selbstverständlich eine Meßfehlerquote, die auf Grund der gerätespezifischen Streuung des "Coulter Counter" zustande kam. Deshalb wurden bei allen 6 Versuchstieren unter den üblichen Bedingungen Blutproben gezogen, bearbeitet und anschließend jede Probe viermal hintereinander gezählt.

	"Flecki"	"Nanni"	"Rille"	"Bruni"	"Ronda"	"Rexe"
	112415	164735	50082	78365	139506	82683
	111571	163134	49953	79464	136597	82316
	111715	163323	50632	76673	137146	89076
	111241	162193	48755	78906	135217	88337
-						
x	111736	163346	49856	78352	137117	85603
SD	± 495	± 1049	± 791	± 1206	± 1788	± 3599
VK	0.4%	0.6%	1.6%	1.5%	1.3%	4.2%
n	4	4	4	4	4	4

Mittelwert aller Variationskoeffizienten: 1.6 % ± 1.4

Die Streuungen des elektronischen Meßgeräts haben demzufolge keine entscheidenden Auswirkungen auf die Zählergebnisse.

Abschließend kann gesagt werden, daß die methodischen Fehler im Bereich von 1.6 - 7.6 % gleichermaßen in alle Meßdaten mehr oder weniger konstant mit eingegangen sind und so die Vergleichbarkeit der Einzelwerte erhalten bleibt.

Selbst bei additiver Wirkung aller Fehler käme man auf max. 17 %.

2.4. Hormonanalytische Verfahren

2.4.1. Allgemeines

Die im Verlauf der Versuchsdurchführung gewonnenen Blutplasmaproben waren bei -20°C gelagert worden und wurden nach Abschluß des Versuchs radioimmunologisch auf die Hormone Progesteron, Östradiol-17 β , LH sowie teilweise FSH untersucht. Dabei fand für Progesteron, LH und FSH ein sogenannter "Direkttest" Verwendung, wohingegen bei Östradiol-17 β der Test erst nach vorausgegangener Extraktion durchgeführt wurde.

Um die Genauigkeit der Laboruntersuchungen abzusichern, wurden bei jedem Test sogenannte "Kontrollen", deren Hormonkonzentrationen bekannt waren, mitbestimmt. Zudem fanden folgende Parameter in allen Tests Beachtung: Gesamtaktivität, Unspezifische Bindung, Absolute Bindung, sowie beim Test nach Extraktion Reagenzienleerwert und externe Wiederfindung.

Zusätzlich wurde beim Östradiol-17 β zur Validierung der bereits vorliegenden Ergebnisse des Extraktionstests dem Radioimmuntest (RIA) ein Verfahren mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorangestellt (siehe 2.4.3.).

2.4.2. Radioimmuntest (RIA)

Der Radioimmuntest stellt ein praktikables, hochempfindliches Nachweisverfahren für Substanzen dar, die in äußerst geringen Konzentrationen (Bereich ng bis pg/ml) vorliegen (Karg, 1985a). Hierbei wird die hohe Nachweisbarkeit radioaktiv markierter Hormone (Antigene) mit der großen Spezifität immunologischer Abläufe (Antigen-Antikörper-Komplexbildung) kombiniert (Schallenberger 1977, Eckert und Strecker 1978). Über die einzelnen Abläufe des RIA in diesem Zusammenhang sei auf die Literatur verwiesen, in der diese Thematik seit nun schon bald zwanzig Jahren eingehend behandelt wird (z.B. Hoffmann, Kyrein, Ender 1973 und Hoffmann 1977).

Gesamtaktivität (GA)

Die Gesamtaktivität wurde bei allen radioimmunologischen Tests durch den Zusatz einer definierten Menge von mit Tritium oder ^{125}I markiertem Antigen (2.5.2) bestimmt.

Unspezifische Bindung (LW)

Hier wurde der Anteil radioaktiven Antigens bestimmt, der nicht vom Antikörper sondern an unspezifischen Oberflächen gebunden wird. Dieser Wert wurde bei der Berechnung der Konzentrationen durch das RIA-Rechenprogramm automatisch bei allen Proben subtrahiert.

Absolute Bindung (BW)

Sie ist Ausdruck für die Bindungskapazität des verwendeten Antikörpers und stellt die maximale Bindung von definierten Antigen- und Antikörpermengen unter Testbedingungen dar. Für eine hohe Testsensitivität sind 30 - 50 % absoluter Bindung anstrebenswert, was jedoch stark abhängig ist von der Verdünnung des jeweilig verwendeten Antikörpers.

Reagenzienleerwert (RLW)

Um die Einflüsse der an der Extraktion beteiligten Reagenzien zu ermitteln, wurde in jedem Test der Reagenzienleerwert bestimmt. Anstelle des Plasmas wurde 0.5 ml Aqua bidest. verwendet. Die weitere Behandlung dieser Proben erfolgte analog den üblichen Testbedingungen.

Externe Wiederfindung (WDF)

Bei dem Test nach vorausgegangener Extraktion mußten unvermeidbare Verluste auftreten. Um diese erfassen zu können wurde die externe Wiederfindung ermittelt.

Bei jedem Test wurden in vierfachem Ansatz vor der Extraktion 0.2 ml ^3H -Östradiol-17 β in Extraktionsgläser pipettiert nachdem anstelle des antigenhaltigen Plasmas 0.5 ml gereinigtes Bullenplasma vorgelegt worden waren. Anschließend wurde die externe Wiederfindung denselben Testbedingungen unterworfen wie die anderen Proben auch, jedoch ohne Zusatz von Antikörper und Aktivkohle.

Durch den Vergleich der Zählausbeute der WDF mit der in demselben Test erhaltenen GA konnte die Wiederfindungsrate bestimmt und in die Berechnung der Östradiol-17 β -Werte als testspezifische Konstante mit einbezogen werden. Sie lag im Mittel bei 90%.

Alle radioimmunologischen Untersuchungen wurden mit Ausnahme des "HPLC-RIA" (Validierung von Östradiol-17 β) im Doppelansatz durchgeführt.

Die einzelnen labortechnischen Schritte seien den nachfolgenden Pipettierschemata entnommen.

2.4.2.1. Direkttest

Tab. 3 Schema der Progesteronbestimmung im Direkttest
(modifiziert nach Abele 1987)

Zugabe in ml	Eichkurve			Standard- punkte (2)	Kontrollproben				biologische Proben (5)
	GA	LW	BW		I	II	III	IV	
Bullen-O-Plasma (1)	0.01	0.01	0.01	0.01	-	-	-	-	-
Standard- verdünnungen (2)	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-
Plasmaproben und Kontrollen	-	-	-	-	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01
Gelatinepuffer	1.09	0.59	0.49	0.39	0.46	0.47	0.48	0.49	0.49
³ H-Progesteron (3)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Antiserum (4)	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Inkubations- volumen	1.2	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Schütteln (Vortex) mind. 2 Sekunden									
Inkubation mindestens 3 Stunden oder über Nacht im Eis-Wasser-Bad									
0.4% Aktivkohle (6)	-	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Gesamtvolumen	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

- (1) O-Plasma : Plasma ohne meßbare Progesteronkonzentrationen
- (2) Standardverdünnungen in Gelatinepuffer
Eichpunkte : 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750 pg/0.1 ml
- (3) ³H-Progesteron in Gelatinepuffer, ca. 10 000 cpm./0.1 ml
- (4) Antiserumverdünnungen in Gelatinepuffer, Endverdünnung 1 : 70 000
- (5) Je nach erwarteter, endogener Konzentration wurde eine Plasmamenge zwischen 0.01 ml (hoch) und 0.04 ml (niedrig) pipettiert und mit der entsprechenden Menge Gelatinepuffer (0.46 bis 0.49 ml) auf 0.5 ml ergänzt. (siehe auch Kontrollen I-IV)
- (6) Aktivkohle aufgerührt und im schmelzenden Eisbad

Schütteln mindestens 30 Sekunden
 Inkubation : 5 Minuten bei 0°C im Eisbad
 Zentrifugation : 20 Minuten, 3000 U/Min., 4°C
 Überstand dekantieren zu 3.5 ml Xylofluor
 Wärmebad : 67.5°C, 10 Minuten
 Szintillationszähler

Die Progesteronkonzentrationen verschiedener Plasmaproben zweier Versuchstiere (Ri, Br) erwiesen sich zeitweise als zu hoch um von dem Computerrechenprogramm, basierend auf den Eichpunkten, exakt erfaßt zu werden, obwohl sie bereits mit der geringst möglichen Aliquotmenge (10µl + 490µl Gelatinepuffer) pipettiert wurden. Aus diesem Umstand heraus entstand die Notwendigkeit, die entsprechenden Proben vor der Durchführung des Direkttests zusätzlich zu verdünnen. Dies erfolgte mit Gelatinepuffer im Verhältnis 1:10, in extremen Fällen (Progesteron > 500 ng/ml) im Verhältnis 1:20.

Die Untersuchung auf LH wurde entsprechend dem von Schams und Karg (1969), bzw. Schams et al. (1974) beschriebenen Radioimmuntest durchgeführt. Bei den Tieren, die über zwei Katheter verfügten (Fl, Ro), wurde primär arterielles Plasma zur Bestimmung herangezogen. Die für diese Arbeit benötigten LH-Daten stellen ein Ergebnis der Teamarbeit dar.

Der Nachweis von FSH erfolgte nach einem speziell entwickelten Verfahren der radioimmunologischen FSH-Bestimmung beim Rind (Schams und Schallenberger 1976, Schallenberger 1977). Die im Rahmen der Teamarbeit ermittelten Daten (Schallenberger et al. 1987) wurden für vorliegende Dissertation zur Verfügung gestellt.

2.4.2.2. Test nach Extraktion

Tab.4 Schema für die Bestimmung von Östradiol-17 β nach Extraktion (modifiziert nach Abele 1987)

Zugabe in ml	Eichkurve			Standard- punkte (1)	biologische Proben, Kontrollen, RLW	Externe Wiederfindung
	GA	LW	BW			
Extraktion	-	-	-	-	0.5	0.5 (6)
Extraktions- mittel (2)	-	-	-	-	3.5	3.5
Horizontalschüttler, 20 Minuten Ausfrieren : mind. 2 Std. bei -60°C Dekantieren in Zentrifugengläser Niedertrocknen des Überstandes (Vortex- Schüttelextraktion oder Wasserbad, 60°C)						
Standard- verdünnungen (1)	-	-	-	0.2	-	-
				Nieder- trocknen		
Antiserum (3)	-	-	0.2	0.2	0.2	-
Gelatinepuffer	0.7	0.2	-	-	-	0.7
Schütteln (Vortex) mind. 5 Sekunden ; Inkubation : 30 Minuten, 25°C						
³ H-Östradiol-17 β (4)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Inkubationsvolumen	0.9	0.4	0.4	0.4	0.4	0.9
Schütteln von Hand mind. 20 Sekunden ; Inkubation über Nacht bei 4°C						
0.4% Aktivkohle (5)	-	0.5	0.5	0.5	0.5	-
Gesamtvolumen	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

- (1) Standardverdünnungen in 100%igem Methanol
Eichpunkte : 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 pg/0.2 ml
- (2) Extraktionsmittel : Mischung aus Petroläther und tertiärerem Butyl-Methyläther im Verhältnis 70/30 (V/V), Proteine im Bodensatz
- (3) Antiserum in Gelatinepuffer, Endverdünnung 1 : 70 000
- (4) ³H-Östradiol-17 β in 100% Methanol, ca. 10 000 cpm./0.2 ml
- (5) Aktivkohle aufgerührt und im schmelzenden Eisbad
- (6) gereinigtes Bullenplasma als Ersatz für antigenhaltiges Plasma, um ein vergleichbares Medium zu schaffen

Schütteln : 1 Minute

Inkubation : 10 Minuten im Kühlschrank bei 4°C

Zentrifugation : 20 Minuten, 3500 U/Min., 4°C

Überstand dekantieren zu 3.5 ml Xylofluor

Wärmebad : 67.5°C, 10 Minuten

Scintillationszähler

2.4.2.3. Validierung der radioimmunologischen Tests ohne HPLC

Um bei den durchgeführten Radioimmuntests einen Überblick über die Genauigkeit der Testaussagen zu erhalten, wurden in jedem der Tests Kontrollproben bekannter Konzentration synchron mit den biologischen Proben mitpipettiert und den üblichen Testbedingungen unterworfen. Um die testinternen Varianzen zu erfassen, waren die Kontrollproben am Anfang, in der Mitte und am Ende eines jeden Tests plaziert worden. Wichtig war zudem, daß die bei -20°C gelagerten Plasmaproben von der gleichen Spezies stammten und in ihren Konzentrationen möglichst den gesamten Meßbereich der Eichkurve abdeckten. So standen bei den Hormonen Progesteron wie auch Östradiol-17 β jeweils 4 Kontrollen niedriger, mittlerer und hoher endogener Hormonkonzentration zur Verfügung. Sie wurden ebenfalls wie die unbekannten Proben im Doppelansatz angesetzt. Die genannten Kontrollen wurden sowohl mehrmals im gleichen (Intra-assay-Variation) als auch in den verschiedenen Tests (Inter-assay-Variation) verwendet (siehe Tab.5).

Basierend auf früheren Erfahrungen und um längere Versuchsserien transparenter zu machen, wurden die unteren Nachweisgrenzen der Hormone Progesteron und 17 β -Östradiol für die vorliegende Dissertation beibehalten.

Sie betragen für: Progesteron 0.5 ng/ml Plasma

 Östradiol-17 β 5 pg/ml Plasma

Tab. 5 Inter- und Intra-assay-Variationen der verwendeten Kontrollen

Hormon	Konzentration			Inter-assay	Intra-assay	Absolute	Wieder-	Reagenzien-
	n	$\bar{x}$	S.D.	V.K. (%)	V.K. (%)	Bindung (%)	findung (%)	leerwert (%)
Östradiol-17β (Extraktion) pg/ml								
Kontrolle A	35	41.4	8.2	19.9	5.5 $\pm$ 4.6			
Kontrolle C	35	263.3	34.3	13.0	4.4 $\pm$ 3.7	44.9 $\pm$ 5.1	88.2 $\pm$ 4.0	1.1 $\pm$ 0.7
Kontrolle II	33	19.0	3.8	20.0	8.1 $\pm$ 6.6			
Kontrolle III	35	4.9	2.1	42.8	19.1 $\pm$ 15.3			
Progesteron (Direkttest) ng/ml								
Kontrolle I	54	0.28	0.12	42.3	33.6 $\pm$ 22.0			
Kontrolle II	54	0.81	0.24	29.3	21.3 $\pm$ 16.7	33.8 $\pm$ 3.6	-	-
Kontrolle III	50	3.80	0.53	13.9	12.6 $\pm$ 8.9			
Kontrolle IV	54	5.16	0.57	11.0	11.0 $\pm$ 7.8			

Die Variationskoeffizienten der Kontrollen beider Hormone sind mit Werten zwischen 10 und 20 % zufriedenstellend. Lediglich die Kontrollen III (Östradiol-17 β) sowie I und II (Progesteron) weisen sowohl im Inter- als auch im Intra-assay eine sehr hohe Schwankungsbreite auf, was wohl auf die Annäherung an die untere Sensitivitätsgrenze der jeweiligen Eichkurve zurückzuführen ist.

Die durchschnittlichen Werte der absoluten Bindung, der Wiederfindung und des Reagenzienleerwertes liegen in einem akzeptablen Bereich.

2.4.3. Radioimmuntest nach Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC-RIA)

2.4.3.1. Anmerkungen zur Durchführung des HPLC-RIA

Das HPLC-RIA-Verfahren diente der punktuellen Absicherung der durch den RIA bereits ermittelten Werte von Östradiol-17 β . Sämtliche Bestimmungen wurden mit der gleichen Säule (2.5.5) bei einer Durchflußrate von 2 ml/Min. und der konstanten Temperatur von 25°C durchgeführt. Das Auftragsvolumen betrug jeweils 0.5 ml.

Der große Aufwand des HPLC-RIA machte es unmöglich, alle vorhandenen Blutproben zu untersuchen. Deshalb wurden möglichst repräsentative Plasmaproben zur Untersuchung herangezogen. So wurden Proben von allen Versuchstieren, aus den verschiedenen Zyklusstadien und aus allen vorkommenden Konzentrationsbereichen ausgewählt.

Durch die HPLC-RIA-Bestimmung sollten vor allem Proben niedriger Konzentration validiert werden, da sichergestellt werden mußte, daß die Ergebnisse des RIA an der unteren Meßbarkeitsgrenze (Östradiol-17 β -Konzentration < 5 pg/ml) ihre Richtigkeit hatten. Deshalb wurden 50% aller der zu dieser Bestimmung herangezogenen Proben (n = 54) aus diesem Konzentrationsbereich ausgewählt.

Im Gegensatz zum herkömmlichen RIA wurden wegen der hohen Aliquotmenge (2 ml) einschließlich der Kontrollen lediglich Einzelproben pipettiert. Nur die Wiederfindung (externer Standard) stand im Doppelansatz zur Bestimmung an.

Der verfahrenstechnische Ablauf des HPLC-RIA gliedert sich auf in drei Hauptarbeitsschritte:

- 1) Extraktion der biologischen Proben und Kontrollen wie auch des Reagenzienleerwertes nach der beschriebenen Verfahrensweise (2.4.2.2), nur das zur Bestimmung eingesetzte Plasmavolumen beträgt nun 2.0 ml statt 0.5 ml wie gehabt.
- 2) Nach dem Niedertrocknen der Proben werden diese nicht wie beim RIA in Antiserum, sondern in dem entsprechenden Laufmittel aufgenommen. Erst jetzt beginnt der eigentliche Ablauf der HPLC.
- 3) Nach Abschluß der HPLC werden die Proben erneut niedertrocknet, in Antiserum aufgenommen und der RIA so fortgesetzt wie bereits beschrieben.

Die Gesamtzahl der zur Untersuchung anstehenden Plasmaproben wurde auf drei Tests zu je 18 Proben aufgeteilt. In jedem der Tests standen zusätzlich am Anfang und am Ende die vom RIA her bekannten Kontrollen, Reagenzienleerwert und Wiederfindung. Die Standardpunkte der Eichkurven wurden erst nach Abschluß der HPLC pipettiert.

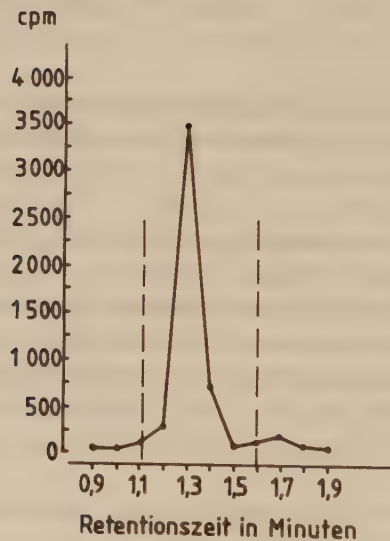
2.4.3.2. Ermittlung der Retentionszeit von Östradiol-17 β

Zudem war die Ermittlung der Retentionszeit von Östradiol-17 β unter den gegebenen Bedingungen von Wichtigkeit, da sich in der gesammelten Fraktion ausschließlich das Östradiol-17 β befinden sollte. So wurden am Anfang wie auch am Ende jedes Tests 0.5 ml ^3H -Östradiol-17 β auf die Probenschleife aufgetragen und nach einer Vorlaufzeit von 0.9 Minuten in Fraktionen von je 0.1 Minuten (= 0.2 ml) im Fraktionssammler gesammelt. Nach Zugabe von 3 ml

Rialuma zu jeder Fraktion wurden diese im Szintillationszähler gezählt. Somit konnte die Retentionszeit ermittelt werden. Demzufolge wurde für die Bestimmung der aufzutragenden Proben eine einzige Fraktion von 0.5 Minuten (= 1 ml) festgelegt, beginnend nach 1.1 und endend nach 1.6 Minuten (siehe Abb.2).

Besonders war darauf zu achten, daß die externe Referenzsubstanz in dem gleichen Laufmittel wie die biologischen Proben (25%iges Acetonitril) gelöst war.

Abb.2 Verhalten der Referenzsubstanz ^3H -Östradiol-17 β bei Auftragen auf die HPLC



2.4.3.3. Arbeitsschritte und technische Details bei der Durchführung der HPLC

Arbeitsschritte:

- Nach dem Niedertrocknen der extrahierten Plasmaproben diese aufnehmen in 550 µl 25%igem Acetonitril
- Schütteln (Vortex, ca. 10 Sekunden)
- Kühlen, am besten im Eis-Wasser-Bad
- Auftragen auf die HPLC (Auftragsvolumen 500 µl)
- Sammeln der Fraktion (1ml) mit Fraktionssammler
- Spülen der Säule zwischen den einzelnen Proben mit 100% Aceton
- Evaporieren der Proben (Vortex-Schüttelevaporator, 60°C)
- Aufnehmen in 0.2 ml Antiserum und Fortsetzen des RIA

Arbeitstechnische Details der HPLC:

Auftragsvolumen	0.5 ml
Betriebstemperatur	25°C
Flußrate	2 ml/Min.
Flußmittel	42% Acetonitril (in Tris-Acetat-Puffer, pH 7.2)
Laufmittel	25% Acetonitril (in Tris-Acetat-Puffer, pH 7.2)
Reinigungsmittel	100% Aceton

2.4.3.4. Validierung des HPLC-RIA

Analog zur Validierung des RIA ohne vorausgegangene HPLC wurden auch beim HPLC-RIA Kontrollproben dem Nachweisverfahren mitunterworfen (siehe 2.4.2.3). Aufgrund der Tatsache, daß nur Einzelproben zur Bestimmung anstanden, wurden die beiden Werte der jeweiligen Kontrollen am Anfang und am Ende der Tests gemittelt und gingen dann in eine Interassay-Variation aus den drei durchgeführten Tests mit ein.

Tab. 6 Interassay-Variation des HPLC-RIA für Östradiol-17 β

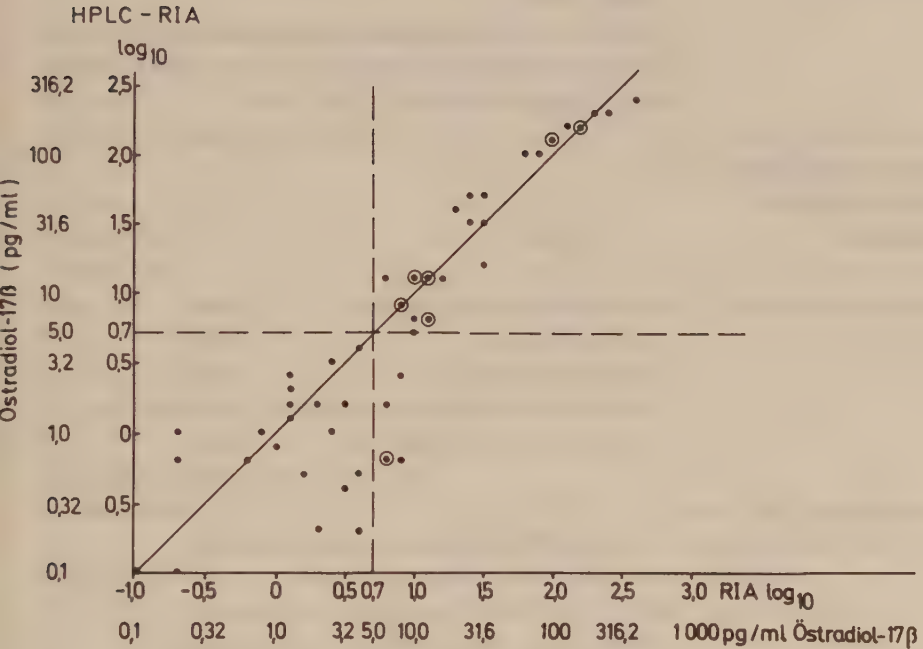
		n	$\bar{x}$	S.D.	V.K. %	Absolute Bindung %	Wieder- findung %
Kontrolle	A	3	50.3	11.3	22.5		
Kontrolle	C	3	203.2	21.9	10.8		
						45.8 $\pm$ 0.2	60.7 $\pm$ 0.5
Kontrolle	I	3	7.3	1.8	24.0		
Kontrolle	III	3	1.8	0.4	24.0		

Bei allen drei Testverfahren wurde mit einem Reagenzienleerwert von 1.0 gerechnet. Die mit 60% auffallend niedrige Wiederfindungsrate ist mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Vorbehandlung durch die HPLC zurückzuführen. Wie auch beim RIA deutet sich anhand der Kontrollen I und III durch den hohen Variationskoeffizienten von 24% die untere Nachweisgrenze des Radioimmuntests unter genannten Bedingungen an.

Außerdem war von Interesse, in wie weit sich die Ergebnisse von RIA sowie HPLC-RIA decken bzw. unterscheiden würden. Aus diesem Grunde wurde eine graphische Darstellung der Korrelation der Wertepaare erstellt, welche in Abb. 3 wiedergegeben wird.

Besonderes Augenmerk lag auf dem Konzentrationsbereich < 5 pg/ml, da beim konventionellen RIA diese Konzentration stets als Grenzwert angegeben wurde. Aus der Abbildung 3 wird ersichtlich, daß alle Ergebnisse des RIA unter der obigen Nachweisgrenze durch die Resultate des HPLC-RIA bestätigt wurden.

Abb. 3 Darstellung der Korrelation von RIA und HPLC-RIA
(Aus Platzgründen wurden die Konzentrationen
logarithmisch dargestellt)



• einmaliges Wertepaar

⊙ doppeltes Wertepaar (zufällige Übereinstimmung)

Konzentrationsvergleich	n	%
HPLC-RIA = RIA	12	22.2
HPLC-RIA > RIA	19	35.2
HPLC-RIA < RIA	23	42.6
n gesamt	54	100

2.4.4. Übersicht über die in den Tests verwendeten Antisera

Progesteron

Antiserum charakterisiert von Hoffmann, Kyrein, Ender (1973)
Anti-11- α -Progesteron-Hemisuccinat (an Rinderserumalbumin gekoppelt) vom Kaninchen P2/III, Mischung vom 5.10.1976

verwendete Anti-
serum-Endver-
dünnung

1 : 70 000

Kreuzreaktionen	17- α -Hydroxyprogesteron	0.8%
	Corticosteron	0.8%
	Desoxycorticosteron	3.4%
	Testosteron, Androstendion,	
	Cortisol, Trenbolonacetat	0.2%

Östradiol-17 β

Antiserum charakterisiert von Schallenger, Schöndorfer, Walters (1985)
Anti-6-keto-17 β -Östradiol-6-carboxy-methyloxim, konjugiert an Rinderserumalbumin vom Kaninchen Nr. E2/II
Mischung vom 6.11.1977

verwendete Anti-
serum-Endver-
dünnung

1 : 70 000

Kreuzreaktionen	Östron	2.0%
	Östradiol-17 β	0.5%
	Östradiolbenzoat	53.0%
	Testosteron, Trenbolonacetat,	
	Diäthylstilböstrol, Zeranol	0.25%

2.5. Materialien

2.5.1. Chemikalien

Tertiärer Butyl-Methyläther	Merck Nr. 1995
Petroläther	Baker Chemikals 8115
Methanol	Baker Chemikals 8045
Szintillationsflüssigkeit	Xylofluor J.T. Baker Chemikals 8589
	Rialuma J.T. Baker Chemikals 8582 P
Azeton	Merck Nr. 14
Acetonitril	Merck Nr. 17
Isoton II	Fa. Coulter Electronics, Krefeld
Isoterge	Fa. Coulter Electronics, Krefeld

2.5.2. Biochemica

Radioaktiv markierte Hormone

Progesteron	1,2,6,7- ³ H-Progesteron TRK. 413, Batch 54, Amersham Int.
Östradiol-17 β	2,4,6,7,16,17- ³ H-Östradiol TRK. 587, Batch 42, Amersham Int.

Richtsubstanzen

Progesteron	Steraloids Inc. Q 2600
Östradiol-17 β	Serva 31100

2.5.3. Lösungen und Puffer

Gelatinepuffer

16.34 g NaCl

1.712 g NaH₂PO₄ · H₂O

2.04 g Na₂HPO₄ · 2H₂O

7.44 g EDTA Titriplex III

2.0 g Gelatine

in 2 l Aqua bidest. bei 37°C lösen, abkühlen auf 20°C,
pH-Wert auf 7.0 einstellen

Tris-Acetat-Puffer, 20 mM, pH 7.2

2.42 g Hydroxy-Methyl-Aminomethan

0.13 g Natriumacid

900 ml Aqua bidest., pH-Wert einstellen auf 7.2,

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

Kohlesuspension

4.0 g Aktivkohle Norit (Serva 30890)

0.4 g Dextran (Serva 18680)

Aqua bidest. ad 1000 ml

Stabilisator

111.7 g 0.3 M EDTA (Titriplex III Merck)

10.0 g 1 % Aspirin (Acetylsalicylsäure)

Substanzen in 200 ml Aqua bidest. aufnehmen,

pH-Wert einstellen auf 7.4, mit H₂O bidest. auffüllen

auf 1 l, aufbewahren bei Zimmertemperatur, Schutz vor

Sonnenlicht (Braunglas)

2.5.4. Medikamente

Estrumate (Cloprostenol)

Fa. ICI Ltd., GB., über

Friesoythe GmbH, Burgwedel

FSH-p

Burns-Biotec, Omaha, Nebraska, USA

Combelen (Chlorpromazin)

Bayer AG, Leverkusen

Rompun (Xylazin)

Bayer AG, Leverkusen

Hostacain - Lösung 2%

Hoechst AG, Frankfurt

Isotonische Kochsalzlösung

Fa. Fresenius, Bad Homburg

Heparin

Fa. Diosynt, Oss, Niederlande

Tardomyocel Comp. III

Bayer AG, Leverkusen

Friesogent

Fa. Friesoythe GmbH, Burgwedel

Vetoprim 24%

Fa. Friesoythe GmbH, Burgwedel

Voren

Fa. Boehringer, Ingelheim

Dexatomanol

Byk Gulden, Konstanz

Merfen Orange

Zyma GmbH, München

Poly-Alkohol-Haut-Antiseptikum

Fa. Albrecht, Aulendorf

2.5.5. Geräte und Materialien

Versuchsdurchführung

Osmotische Minipumpen

Fa. Alza Corporation,
Palo Alto, Cal., USA

Blutentnahmekatheter

Fa. Dural Plastics & Eng.
Phy. Ltd. Australien

Plasmagewinnungsröhrchen

Fa. Sarstedt

Plasmaaufbewahrungsröhrchen

Fa. Sarstedt

Piccolo-Zentrifuge

Fa. Martin Christ, Osterode

Hämatokritzentrifuge

Sigma 201 M

Mikro-Hämatokritröhrchen

Fa. Brand, Kat.Nr.749321

Kühlzentrifuge

Sigma 4 K-1

Operationsbestecke

Fa. Hauptner, München

Coulter Counter

Fa. Coulter Electronics, Krefeld

Pipetten

Eppendorf 10 - 1000 µl

Labortechnik

RIA

Pipettiermaschinen

Hamilton Digital Diluter und
Micro Lab 1000, Hamilton GmbH,
Darmstadt

Zählküvetten

Mini-Vials, Baker Chemicals

Kühlzentrifugen

Sigma 4 K-1

Szintillationszähler

Beckman LS 7000

Berthold betaszint 5000/300

1209 Rackbeta, LKB, Wallac

Evaporator

Vortex, Buchler

Rechner und Drucker

Facit

RIA-Programm

Fa. Görlitz, Computerbau

HPLC

Pumpe

HPLC-Pump 420, Kontron Instruments

Säule

Hibar LiChroCart, 50 x 4 mm,
RP-18, Teilchengröße 5 µm,
E.Merck, Darmstadt

Thermostat

Haake Typ FE 2, Berlin

Fraktionssammler

Fraction Collector Frac 100,
Pharmacia Fine Chemicals

3. Ergebnisse

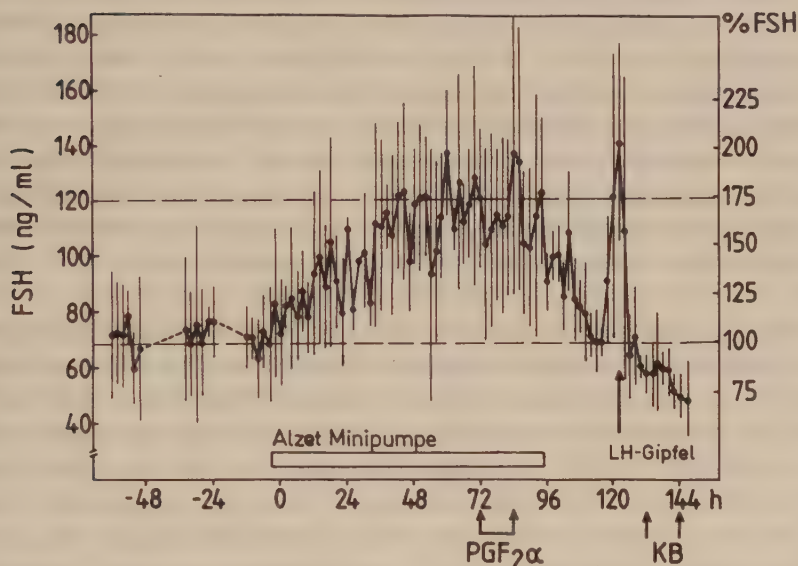
3.1. Resultate des Versuchs "Superoovulation-Mehrlingsgravidität"

3.1.1. Superoovulationsstimulation mittels FSH-p durch Einsatz der Alza osmotischen Minipumpe

Nach Implantation der Minipumpen nahmen diese gemäß den Angaben des Herstellers ihre Tätigkeit auf. Binnen 36 Stunden kam es auf Grund der kontinuierlichen Applikation ($10.6 \mu\text{l/h} \pm 0.4$) von schweinehypophysärem FSH zu einer kaskadenartigen endogenen Konzentrationserhöhung von ca. 75% (siehe Abb. 4). Diese FSH-Werte wurden für die Dauer von etwa 60 Stunden, also bis zur Entnahme der Pumpen, beibehalten. Unmittelbar im Anschluß daran fiel FSH wieder auf Werte von ca. 70 ng/ml (= 100%-Wert) ab, um dann erst zum Zeitpunkt des LH-Gipfels 24 Stunden nach Entnahme des Implantats Konzentrationen von bis zu 140 ng/ml zu erreichen. Nach dem LH - Gipfel fiel FSH konsekutiv innerhalb 24 Stunden auf etwa 50 ng/ml ab.

Zur Ermittlung des Basiswertes von FSH (= 100%) wurden die Konzentrationen der im 2-stündigen Abstand gewonnenen Blutproben für die Dauer von 58 Stunden vor der Implantation der osmotischen Minipumpen herangezogen.

Abb. 4 Konzentrationserhöhung von FSH bedingt durch die kontinuierliche Hormonabgabe der Alza Minipumpe (in die Abb. gingen die Mittelwerte aller 3 durch die Minipumpe stimulierten Tiere mit ein)



3.1.2. Vergleichende Darstellung der beiden Stimulationsverfahren Injektion versus Minipumpe

Um die beiden zum Einsatz gekommenen Stimulationsverfahren miteinander vergleichen zu können, wurden aus dem Versuchstiergut jeweils 2 Tiere der Versuchsgruppen Injektion und Minipumpe ausgewählt. Wie aus der Abb. 5 ersichtlich, sollten je ein Tier mit sehr guter und mäßiger Ovarreaktion (Ri/Na, Br/Re) zur Darstellung kommen. Bei den beiden nicht erfaßten Probanden (Fl, Ro) der zwei Versuchsgruppen handelt es sich um 2 Tiere mit mäßigen Ovarreaktionen (2.2.7., Tab. 2). Der Erfolg der Ovarstimulation zeigt sich in der Anzahl der angebildeten Graaf'schen Follikel, was auch durch die Konzentrationserhöhung von Östradiol-17 β mit Werten von 30 bis 150 pg/ml reflektiert wird.

Bei den beiden Tieren mit sehr guter Ovarreaktion (Ri, Br) zeigt sich unabhängig vom Stimulationsmodus ein nahezu parallel verlaufender kaskadenartiger Anstieg von Östradiol-17 β , etwa 24 h nach Stimulationsbeginn aus dem Grundniveau von < 5 pg/ml bis auf 150 pg/ml. Diese follikelbedingte Östrogenerrhöhung erlangt ihren Höhepunkt in beiden Fällen beim Erreichen des präovulatorischen LH-Gipfels 49 (Ri) bzw. 42 (Br) Stunden nach der 1. PGF $_{2\alpha}$ -Injektion mit Werten von über 400 pg/ml. Das Östradiol-17 β -Profil der zwei dargestellten Tiere mit mäßigem Stimulationserfolg (Na, Re) entspricht dem der guten Reagenten im Verlauf weitgehend, nur daß hier der Östrogenanstieg erst nach 70 (Na) bzw. 96 (Re) Stunden und sehr viel moderater aus dem schon genannten Basiswert auf Konzentrationen bis 30 pg/ml (präovul. LH-Gipfel) erfolgt.

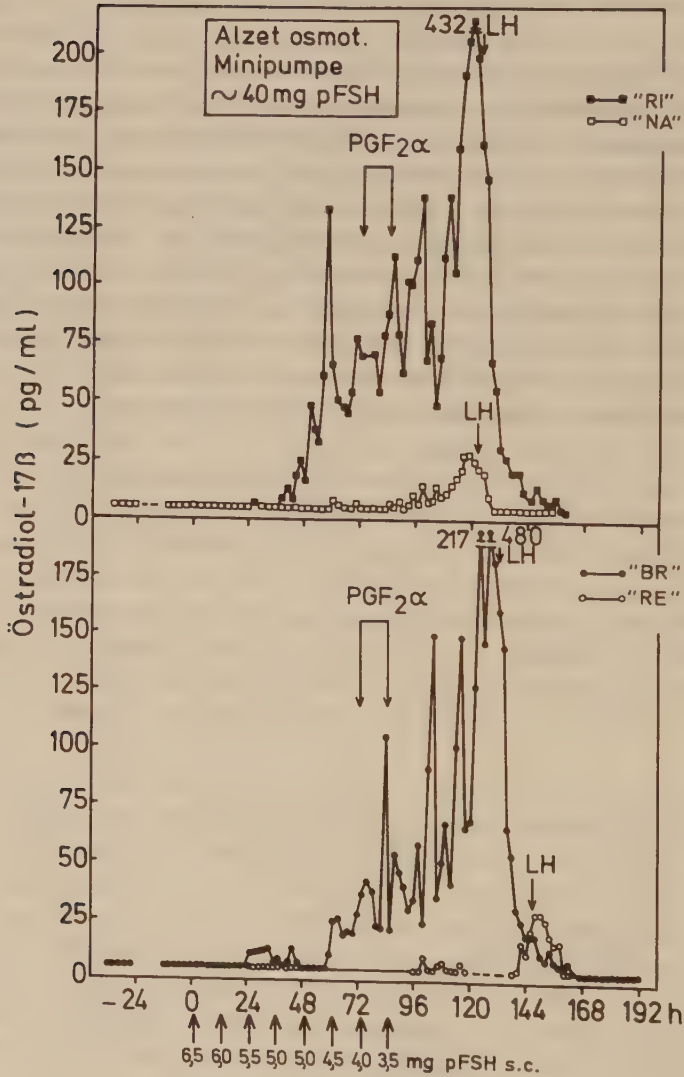
Zeitlich nahezu deckungsgleich sind die durch den präovulatorischen LH-Gipfel bedingten Östradiol-17 β -Spitzenwerte bei den zwei durch die Minipumpe superovulierten Tieren. Auch das nicht dargestellte Tier (Fl) dieser Gruppe liegt mit einem LH-Gipfel von 56 Stunden post PGF $_{2\alpha}$, reflektiert durch 30 pg/ml Östradiol-17 β , zeitlich dicht bei den beiden anderen. Im Mittel ergab sich bei der durch osmotische Minipumpen stimulierten Tiergruppe ein präovulatorischer LH-Gipfel 51 ± 4 h nach Applikation eines Prostaglandinanalogs (siehe Tab. 7). Die Standardabweichung von 4 Stunden verdeutlicht die geringe Schwankungsbreite, unabhängig vom Stimulationserfolg. Analog zu den dicht gelagerten LH-Gipfeln kamen die Tiere mit Minipumpen auch sehr gleichmäßig (36.6 ± 2.3 Std.) in Brunst (Schwäbl 1987).

Betrachtet man dagegen im Vergleich dazu die durch Injektion im 12-stündigen Abstand zur Superovulation gebrachten Tiere, so ergibt sich hier ein präovulatorischer LH-Gipfel 60 ± 18 Std. nach Prostaglandininjektion (siehe Tab. 7), wobei das in der Abbildung dargestellte Versuchstier "Bruni" mit seiner sehr guten Ovarreaktion und einem LH-Gipfel nach 42 h an der unteren Grenze liegt. Eine Standardabweichung von 18 Std. zeigt eine sehr viel größere Schwankungsbreite auf als bei den durch Minipumpen superovulierten Tieren. Auch das Auftreten äußerer Brunsterscheinungen nach Stimulation (34.0 ± 9.1 Std.) variiert hier sehr viel mehr (Schwäbl 1987).

Wird der Beginn des Östradiol-17 β -Anstiegs nach Stimulationsanfang bei beiden Verfahren verglichen, so ergibt sich, daß die Tiere mit Minipumpe analog obiger Resultate nach 48.6 ± 10 Stunden deutlich früher und mit geringerer zeitlicher Streuung erste Östrogenschübe aufweisen als jene der Gruppe "Injektion" (69 ± 28.7 Std.).

Abschließend kann gesagt werden, daß die Ovarreaktion der Tiere vom Stimulationsverfahren unabhängig individuell großen Schwankungen unterliegt. Desweiteren scheint die Ovarstimulation durch osmotische Minipumpen eine durchaus gleichwertige, wenn nicht gar überlegene Alternative zur herkömmlichen Methode der Injektion zu sein. Dabei hat die kontinuierliche Hormonabgabe offensichtlich einen vom Stimulationserfolg unabhängigen Einfluß auf den Zeitpunkt des präovulatorischen LH-Gipfels. Dieser tritt nämlich relativ konstant 51 ± 4 Stunden nach Applikation von PGF $_{2\alpha}$ auf. Zudem treten die äußeren Brunstsymptome gleichmäßig 36.6 ± 2.3 Stunden nach Prostaglandinapplikation in Erscheinung.

Abb. 5 Vergleichende Darstellung der Superovulationsstimulation durch osmotische Minipumpen und Injektion anhand der Verlaufskurven von Östradiol-17 β



3.1.3. Verzögerung des LH-Gipfels im Falle des Versuchstiers "Nanni"

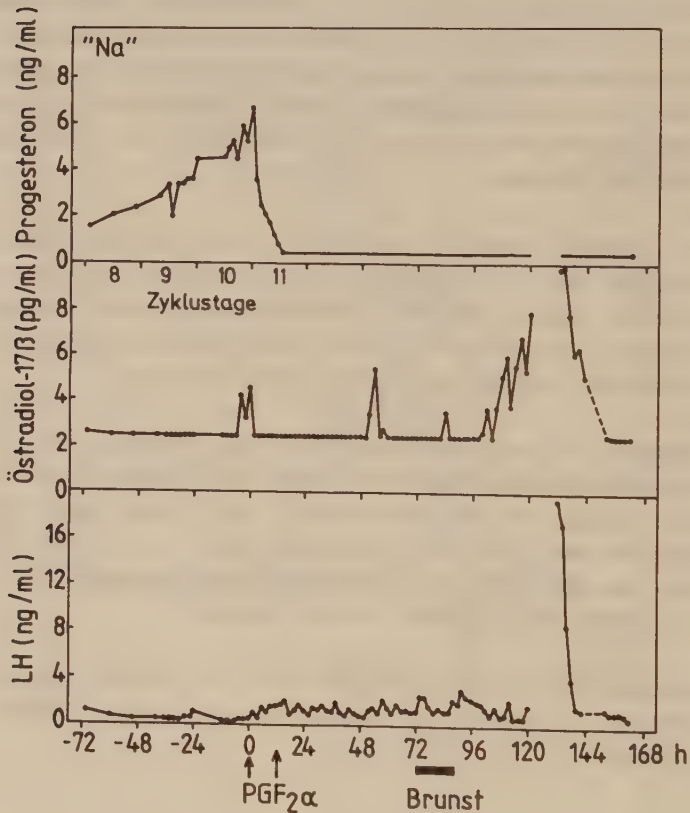
Ein bei der Versuchsplanung nicht beabsichtigter Zufallsbefund ergab sich bei der Analyse der Blutproben des Tieres "Nanni", die während der Luteolyseinduktion zur Zyklussynchronisation gewonnen wurden. Ein Vergleich der protokollarisch festgehaltenen Brunstbeobachtungsdaten eröffnete eine Diskrepanz zu den hormonanalytisch erhaltenen Werten.

So kam es, bedingt durch die Applikation eines Prostaglandinanalogs, innerhalb von 12 Stunden zu einem initialen Abfall von Progesteron von 6.7 ng/ml auf Werte unter 0.5 ng/ml, die dann im Anschluß auch über den Zeitraum von 12 Tagen (bis Zyklustag 7) ohne jeglichen Anstieg beibehalten wurden (Abb.6 oben).

Die Verlaufskurve von Östradiol-17 β weist zunächst zwei kleine Konzentrationserhebungen zum Zeitpunkt der PGF_{2 α} -Injektion und 45 Stunden danach aus dem Grundniveau von 3 pg/ml bis auf 3.7 bzw. 4.7 pg/ml auf, um dann 132 Stunden post PG zu einem deutlichen Gipfel von bis zu 10 pg/ml und nahezu 48 Stunden (96 - 144 h post PGF_{2 α}) Dauer anzusteigen (Abb.6, Mitte).

Der präovulatorische LH-Gipfel tritt erst 132 Stunden post PG mit Konzentrationen von bis zu 19.6 ng/ml und 16 Stunden Dauer auf (Abb.6 unten).

Abb.6 Übersicht über Hormonverläufe des Tieres "Nanni" nach Luteolyseinduktion im Zyklus



Das bereits angedeutete Phänomen besteht darin, daß das Versuchstier 72 Stunden post PG über den Zeitraum von 16 Stunden deutliche Brunstsymptome zeigte, die von zwei unabhängigen, mit der Materie vertrauten Personen protokolliert wurden. Die Symptome äußerer Brunst gehen jedoch nicht einher mit einer vermehrten Sekretion von Östradiol-17 β . Diese erfolgt erst zusammen mit dem LH-Gipfel 132 Stunden nach Gabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$. Im Vergleich mit den anderen Versuchstieren ergaben sich folgende Zahlen (Schwäbl 1987, Schallenberger et al. 1987) :

	"Nanni"	Durchschnittswerte der anderen Versuchstiere
Zeit von PGF _{2α} bis äüßerl. Brunst (h)	72	55.6 ± 14.2
Zeit von PGF _{2α} bis LH-Gipfel (h)	132	70.0 ± 18.6
Brunstbeginn bis LH-Gipfel (h)	60	13.6 ± 10.8
Brunstdauer (h)	16	29.2 ± 10.1
maximale LH-Konz. (ng/ml)	19.6	18.3 ± 2.6
Durchschnittliche Progesteronwerte 12 Std. vor PGF _{2α} (ng/ml)	5.2	5.6 ± 2.0
Zeit (h) bis Pro- gesteron < 1 ng/ml	12	14.0 ± 3.7

Aus den obigen Zahlen wird ersichtlich, daß im vorliegenden Falle des Tieres "Nanni" lediglich die Zeiträume betreffend den LH-Gipfel eine weit außerhalb der Standardabweichung liegende Rechtsverschiebung erfahren, alle anderen Kriterien jedoch durchaus im Durchschnitt der restlichen Versuchstiere liegen.

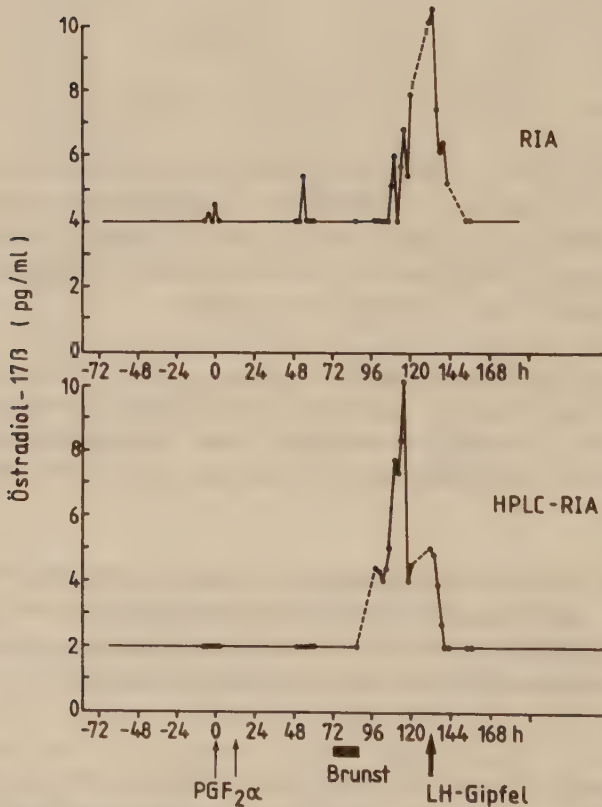
Genaue Studien der Versuchsprotokolle ergaben, daß das Tier zu diesem Zeitpunkt des Versuchs aufgrund eines beidseitig-mittelgradigen Rusterholtz'schen Sohlengeschwürs der Hintergliedmaßen einer tierärztlichen Klauenbehandlung unterzogen wurde und hochgradig lahm ging.

Desweiteren ergab sich aus den Versuchsprotokollen, daß das Nachbartier "Flecki", welches mit "Nanni" die Boxe teilte, exakt mit einer Stunde Unterschied ebenfalls äußere Brunstsymptome, allerdings mit den entsprechenden endogenen Hormonveränderungen, aufwies.

Um die im RIA ermittelten Werte von Östradiol-17ß im Falle von "Nanni" abzusichern, wurden die jeweiligen Plasmaproben dem Verfahren des HPLC-RIA (2.4.3) unterworfen. Die Konzentrationserhö-

hung von Östradiol-17 β zum Zeitpunkt des verzögerten LH-Gipfels erwiesen sich mit einer Diskrepanz von wenigen Stunden als richtig. Lediglich die zwei geringgradigen Östrogengipfel im vorherigen Verlauf hatten nach durchgeführtem HPLC-RIA keinen Bestand. Auch nach dem Einsatz des HPLC-RIA in der Analyse konnte während des Auftretens äußerer Brunstsymptome keine vermehrte Sekretion von Östradiol-17 β festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Evaluierung sind in Abbildung 7 wiedergegeben.

Abb.7 Vergleichende Darstellung der Werte von Östradiol-17 β aus RIA und HPLC-RIA



3.1.4. Gegenüberstellung des Verlaufs der Luteolysen nach Zyklussynchronisation und bei Superovulation

Interessant war es zu erfahren, ob und in wie weit hormonelle Sekretionsmuster superovulierter Rinder von jenen zyklischer Tiere abweichen würden. Aus diesem Grunde sollten stellvertretend für das verbleibende Versuchstiergut (Ri/Na, Ro/Re) je ein gut (Br) und ein mäßig (Fl) reagierendes Tier vergleichend dargestellt werden. Dabei steht das Tier "Bruni" für die Versuchsgruppe "Injektion" und das Tier "Flecki" für die Gruppe "Minipumpe". Bei beiden wurde peripheres Blut zur Bestimmung herangezogen.

3.1.4.1. Verlauf von Progesteron im Vergleich

Im Zyklus fällt Progesteron innerhalb von 8 (Fl) bzw. 12 (Br) Stunden auf Konzentrationen unter 1 ng/ml ab ausgehend von Werten von 2.9 (Fl) bzw. 5.2 (Br) ng/ml.

Nach Superovulation hingegen sind Werte unter 1 ng/ml erst nach 26 (Fl) bzw. 24 (Br) Stunden erreicht. Ebenfalls als verändert erweisen sich die Ausgangskonzentrationen von Progesteron bei Gabe von PG. So erfolgt der Progesteronabfall auf Werte < 1 ng/ml ausgehend von 11.0 (Fl) und 8.0 (Br) ng/ml (Abb.8 und 9). In beiden Fällen reagiert Progesteron sofort mit einem initialen Konzentrationsabfall auf die 1. Injektion von Prostaglandin $F_{2\alpha}$.

Betrachtet man die durchschnittlich ermittelten Zahlen aller Versuchstiere, so ergibt sich folgendes Bild:

	Zyklus	Superovulation
Progesteronabfall nach $PGF_{2\alpha}$ -Applik. auf < 1 ng/ml (h)	13.2 ± 4.4	22.8 ± 5.4
Ausgangskonzentr. Progesteron bei Gabe von $PGF_{2\alpha}$ (ng/ml)	5.4 ± 2.0	8.2 ± 2.8

Im Vergleich von Zyklus zu Superovulation zeigt sich, daß bei der Luteolyse nach Follikelstimulierung die Progesteronwerte bei Applikation von PGF_{2α} um durchschnittlich 34% erhöht sind und nahezu 10 Stunden länger benötigen, um unter 1 ng/ml zu fallen.

3.1.4.2. Verlauf von LH im Vergleich (die LH-Daten wurden im Rahmen der Teamarbeit zur Verfügung gestellt)

Auffallend im Vergleich der beiden Stimulationsverfahren ist, daß die Basiswerte von LH nach der Injektion von Prostaglandin im Zyklus im Gegensatz zur Superovulation einen geringgradigen Anstieg um 0.9 ± 0.4 ng/ml aufweisen.

Diese erhöhte Sekretion bleibt von der 1. PG-Gabe bis zum Erreichen des präovulatorischen LH-Gipfels 70.0 ± 18.6 Stunden (Wert "Nanni" wurde nicht berücksichtigt, da hier gesonderte Verhältnisse vorliegen, siehe 3.1.3) bestehen.

Bei der Luteolyse zur Superovulation fehlt dieser Anstieg der Basalkonzentration ganz. Hier verbleibt LH sehr konstant um 0.7 ng/ml in seinem Basisniveau, um sich daraus 55 ± 13 Stunden post PGF_{2α} unmittelbar zum LH-Gipfel zu erheben. Dieses Verhalten von LH tritt unabhängig vom Stimulationsmodus wie auch unabhängig von der Ovarreaktion auf (Abb. 8 und 9).

Den Vergleich der Daten aller Versuchstiere im Mittel gibt folgende Übersicht wieder:

	Zyklus	Superovulation
Zeit von PGF _{2α} bis		
LH-Gipfel (h)	70.0 ± 18.6	55.3 ± 12.5
maximale		
LH-Konz. (ng/ml)	18.3 ± 2.6	14.3 ± 6.2
Dauer der		
LH-Gipfel (h)	12 ± 2	13.6 ± 2.0

Demzufolge scheint bei der Luteolyse zur Superovulation, abgesehen von den Verhaltensunterschieden von LH vor dem präovulatorischen LH-Gipfel, selbiger sowohl um durchschnittlich 15 Stunden vorverlegt als auch in seiner Absolutkonzentration geringgradig (22%) erniedrigt zu sein. Betreffend die Dauer des LH-Gipfels ergeben sich keine Unterschiede.

3.1.4.3. Verlauf von Östradiol-17 β im Vergleich

Im Falle der Luteolyseinduktion im Zyklus kommt es 31.2 ± 16.4 Stunden vor dem präovulatorischen LH-Gipfel zu einem mäßigen Anstieg von Östradiol-17 β , der zum Zeitpunkt des LH-Gipfels Spitzenwerte von 11.4 ± 2.4 pg/ml erreicht, welche jedoch in kurzer Zeit (7.2 ± 3.0 Std.) wieder zu dem Ausgangsniveau von < 5 pg/ml zurückfallen (Abb.8 und 9).

Die Dauer der erhöhten Östradiol-17 β -Sekretion lag im Durchschnitt bei 38.4 ± 15.4 Stunden.

Deutliche Unterschiede treten im Gegensatz zum Zyklus bei der Luteolyseinduktion zur Superovulation auf. Hier zeigt sich bereits 60.3 ± 12.7 Stunden vor dem LH-Gipfel ein markanter Östradiol-17 β -Anstieg, der konsekutiv und in Abhängigkeit der sich abzeichnenden Ovarreaktion erfolgt. Letztendlich werden die Höchstkonzentrationen von 103 ± 80.6 pg/ml beim Erlangen des LH-Gipfels erreicht (Spitzenwerte der Tiere mit VC-Katheter von 432 und 480 pg/ml sind durch Mittelwerte, gebildet aus Daten um den LH-Gipfel, ersetzt). Innerhalb von 17.6 ± 7.9 Stunden ist das vor der Östradiolsekretion herrschende Basisniveau von < 5 pg/ml wieder erreicht. Die Gesamtdauer des im Zuge der Superovulation stattfindenden Anstiegs von Östradiol-17 β beträgt 88 ± 20.7 Stunden.

Interessant ist noch, daß es bereits durchschnittlich 59 ± 22.3 Stunden nach Stimulationsbeginn bei allen superovulierten Tieren zu einer meßbaren Östrogensekretion kommt. Der Vergleich der Brunstdaten wird aus nachfolgender Übersicht erkennbar:

	Zyklus	Superovulation
Zeit PGF _{2α} bis		
Brunst (h)	55.6 ± 14.2	35.3 ± 6.2
Brunstdauer (h)	29.2 ± 10.1	39.7 ± 5.1

Somit wird deutlich, daß alle superovulierten Tiere ca. 20 Stunden früher Brunsterscheinungen aufzeigten als im Kontrollversuch im Zyklus. Die Brunstdauer erscheint geringgradig verlängert. Auffallend ist zusätzlich die geringe Schwankungsbreite der Brunstdaten aus Superovulation, erkennbar an den Standardabweichungen von 6.2 bzw. 5.1 Stunden (V.K. 17.6% bzw. 12.8%).

Zusammenfassend läßt sich im Vergleich zum Zyklus feststellen, daß während der Luteolyse zur Superovulation sowohl eine sehr viel frühere und deutlich längere Erhöhung von Östradiol-17ß stattfindet als auch die zum Zeitpunkt des LH-Gipfels erreichten Spitzenwerte signifikant höher sind. Trotzdem fallen die Östradiol-17ß-Konzentrationen nach dem oft nur sehr mäßigen LH-Gipfel sehr rasch ab. Diese Sekretionsbilder finden ihren Ausdruck in analog dazu auftretenden äußeren Brunstsymptomen.

Abb.8 Vergleichende graphische Darstellung der Luteolysen im Zyklus und während Superovalationsbehandlung anhand des Tieres "Bruni"

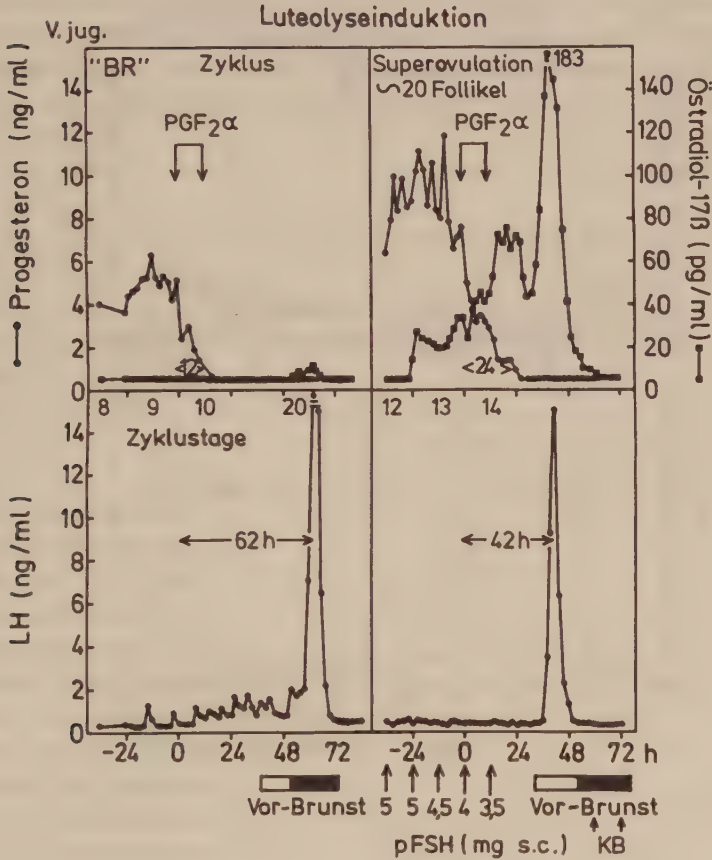
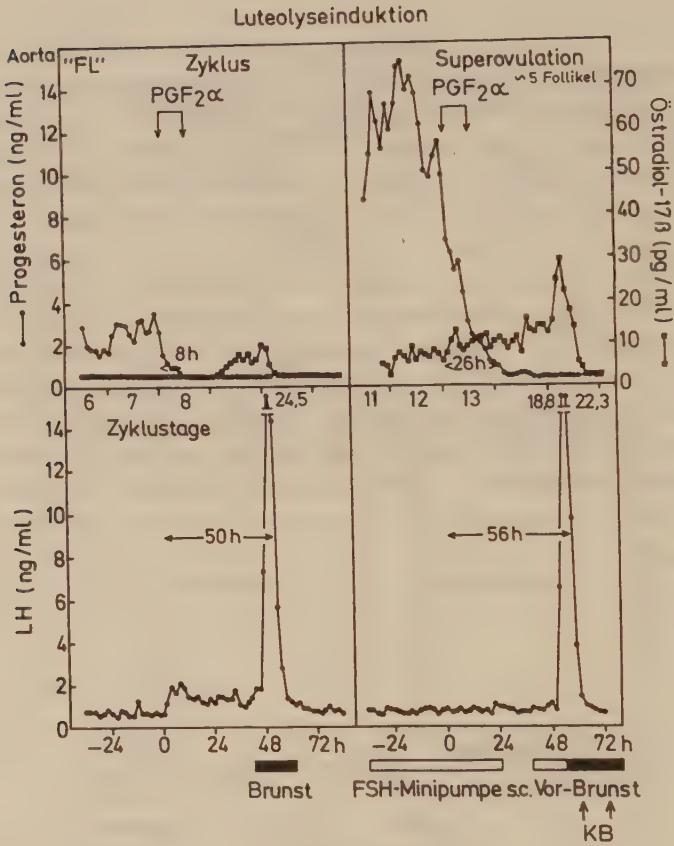


Abb.9 Vergleichende graphische Darstellung der Luteolysen im Zyklus und während Superovulationsbehandlung anhand des Tieres "Flecki"



3.1.5. Luteolyse bei bestehender Mehrlingsgravidität

Am Tag 24 der multiplen Gravidität wurde bei allen Versuchstieren durch die intramuskuläre Applikation eines $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analoges erneut Luteolyse induziert. Im Anschluß an die hormonanalytischen Untersuchungen ergab sich, daß die Tiere "Ronda" und "Rexe" eine spontane Luteolyse nach 11 bzw. 23 Tagen der Gravidität aufwiesen, wohingegen die restlichen Probanden sich nach wie vor in der Lutealphase befanden. So zeigte "Ronda" 21 Tage nach KB eindeutige Brunstsymptome, bei "Rexe" fielen die Prostaglandininjektionen am Tag 24 mit dem bereits ablaufenden Vorgang einer spontanen Luteolyse zusammen.

3.1.5.1. Spontane Luteolyse bei bestehender Mehrlingsgravidität

Näheren Aufschluß über die Spontanluteolysen der Tiere "Ronda" und "Rexe" unter genannten Bedingungen gibt die folgende Übersicht:

	"Ronda"	"Rexe"
Graviditätstag	11	23
Progesteronkonz. 24 - 0 Std. vor		
Abfall (ng/ml)	43.7	28.9
Progesteronabfall bis Brunst (Tage)	8	11
Progesteronabfall bis LH-Max. (Tage)	7.5	11
Zeit bis Progest. < 1 ng/ml (Tage)	4	3
Zeit LH-Gipfel bis Brunst (h)	14	(4-8)

Auffallend bei beiden Tieren ist, daß sie nach der Zeitspanne des Progesteronabfalls bis zum LH-Maximum von 7.5 bzw. 11 Tagen erst äußerliche Brunstsymptome zeigen, die mit 14 bzw. 4-8 Stunden nach dem LH-Gipfel auftreten. Während die Brunst des Tieres

"Ronda" über den Zeitraum von 78 Stunden von einer deutlichen Östradiol-17 β -Sekretion mit Werten von 5 bis 15 pg/ml begleitet ist, fehlt diese Östradiolerhöhung bei "Rexe" ganz. Hier bleiben die Konzentrationen konstant unter 5 pg/ml, obgleich sich trotz nur zweimaliger Blutentnahme pro Tag zu diesem Zeitpunkt ein prä-ovulatorisches LH-Maximum 4-8 Stunden vor der äußerlichen Brunst andeutet.

Betrachtet man den auf obige Brunst folgenden Zyklus, so ist der beider Tiere mit 25 (Ro) bzw. 26 (Re) Tagen verlängert (Tab. 7).

3.1.5.2. Induzierte Luteolyse bei bestehender Mehrlingsgravidität

Bei den verbleibenden 4 Tieren (Fl, Na, Ri, Br) war am Tag 25 nach der Besamung, dem Zeitpunkt der Luteolyseinduktion, ein stabiles Progesteronplateau mit absoluten Konzentrationen von 11 bis 351 ng/ml, abhängig von der Anzahl der angebildeten Corpora lutea und der jeweiligen Katheterposition, zu verzeichnen. So konnten bei den Tieren mit den sehr guten Ovarreaktionen die höchsten Absolutwerte gemessen werden ("Bruni", "Rille"), je nach dem wie stark sich eine mögliche Hormonverdünnung aufgrund unterschiedlicher Katheterlage (VJU, VC) auswirkte.

Zur graphischen Darstellung sollen stellvertretend je ein Tier mit sehr guter (Br) und mäßiger (Fl) Ovarreaktion kommen. Bei beiden wurde wegen der besseren Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse peripheres Blut (VJU, AO) zur Untersuchung herangezogen (Abb. 10).

Desweiteren soll daran erinnert werden, daß bei dem Tier "Nanni" am Tag 19 (2.2.6.) nach einer diagnostischen Laparatomie ein Ovar extirpiert werden mußte, was sich hormonanalytisch unmittelbar und sehr markant in einem Rückgang der Progesteronkonzentration von 15 auf 8 ng/ml widerspiegelte, ohne daß es in Folge zu einer spontanen Luteolyse kam.

Nähere Einzelheiten sollen in nachfolgender Übersicht wiedergegeben werden (modifiziert nach Schwäbl 1987):

	"Flecki" (AO)	"Nanni" (VJU)	"Rille" (VC)	"Bruni" (VJU)
Progesteron vor PG				
48 - 0 Std. (ng/ml)	27.7	11.1	(351)	79.6
Zeit bis Progesteron unter 1 ng/ml (h)	88	14	-	228
Zeit Prostaglandinappl. bis Brunst (Tage)	6	6	11	27
Zeit Prostaglandinappl. bis LH-Maximum (h)	154	158	270	636
Brunstbeginn bis LH-Gipfel (h)	16	20	15	0
Brunstdauer (h)	34	22	25	28
Östradiol-17 β gesamt während der Brunst (h)	12	16	(132)	-
Maximalwerte von Östradiol-17 β (pg/ml)	6.2	6.4	(48.2)	5.4

Die im Vergleich zu den drei anderen Tieren auffallend hohen Konzentrationenwerte bei "Rille" in obiger Tabelle sind wohl auf die besondere Katheterposition unmittelbar cranial der Einmündungsstelle der Vena ovarica in die caudale Hohlvene zurückzuführen.

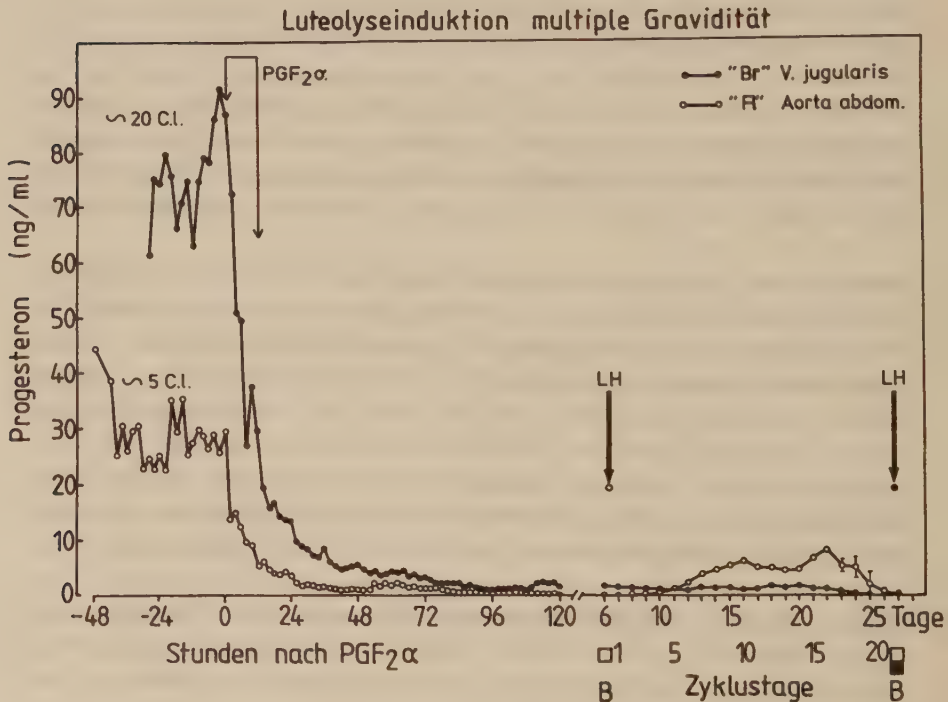
Infolge der Luteolyseinduktion durch die Applikation eines Prostaglandinanalogs kommt es bei allen Tieren sofort zu einem initialen Abfall von Progesteron. Im Anschluß daran werden Konzentrationen > 1 ng/ml unterschiedlich lange (110 ± 108 Std.) beibehalten. Dabei fällt auf, daß die Tiere mit den meisten Corpora lutea (Br, Ri) auch am längsten für diese Entwicklung brauchen (Br 228 Std.). Bei der Kalbin "Rille" fallen die Werte sogar nicht unter 2.1 ng/ml, trotz schwacher Brunstsymptome und sehr mäßigem LH-Gipfel 270 Stunden nach Prostaglandininjektion.

Erst nach gänzlichem Progesteronabfall auf unter 0.5 ng/ml kommt es zur Brunst 12 ± 9 (6 bis 27) Tage post PG. Die präovulatorischen LH-Maxima waren mit 13 ± 9 Stunden nach Brunstbeginn dicht an die schwach ausgeprägten Östrusercheinungen assoziiert und von geringen Östradiol-17 β -Werten (um 6 pg/ml) kurzer Dauer (12-16h)

begleitet. Hierbei sind die Daten des Tieres "Rille" aufgrund des genannten Sonderfalles nicht berücksichtigt, während bei der Kalbin "Bruni" infolge des späten Brunstzeitpunktes 27 Tage post PGF_{2α} und der zu dieser Zeit nur zweimal täglichen Blutentnahme keine genauen Angaben mehr möglich sind.

Trotz vermindelter absoluter Progesteronsekretion (7.3 ± 4.2 ng/ml, ohne "Rille") weisen die darauf folgenden Zyklen (inklusive "Ronda" und "Rexe") eine Dauer von 25 ± 2 (21 - 27) Tagen auf. Dabei konnte der nächste Zyklus der "Bruni" wegen des Versuchsendes nicht mehr erfaßt werden (Tab. 7).

Abb.10 Darstellung der Luteolyse nach multipler Gravidität an Hand der Tiere "Bruni" und "Flecki"



Tab.7 Luteolyseinduktion beim Rind in verschiedenen Fertilitätsstadien

PGF _{2a} → LH-Gipfel					
		Zyklus (h)	Super - ovulation (h)	multiple Gravidität (Tage)	nächster Zyklus (Tage)
Injektion	Br	62	42	27	?
	Re	96-110	78	9	26
	Ro	81	59	-	25
Minipumpe	Ri	60	49	11	24
	Na	132	48	6	27
	Fl	50	56	6	21
	$\bar{x}$	81 ±	55 ±	12 ±	25 ±
	SD	31h	13h	9 Tage	2 Tage

3.1.6. Verhalten der fertilitätsspezifischen Hormone während der multiplen Gravidität

Die hormonellen Sekretionsmuster während der frühen Mehrlingsgravidität des Rindes waren von nicht unerheblichem Interesse um eventuelle Unterschiede zur Einlingsgravidität abschätzen zu können.

So kommt es nach dem präovulatorischen LH-Gipfel bei allen superovulierten Tieren innerhalb 62.2 ± 9.5 Stunden zu einem Progesteronanstieg über 1 ng/ml, der sich dann in Folge der sich abzeichnenden Lutealphase je nach Ovarreaktion und Katheterposition zu den schon erwähnten (3.1.5.2) Konzentrationen von 15 (Na) bis 350 (Ri) ng/ml fortsetzt bis zur Spontanluteolyse der Tiere "Ronda" und "Rexe" bzw. der Luteolyseinduktion bei den restlichen 4 Tieren.

Bei der Betrachtung von LH nach dem LH-Maximum ergibt sich, daß das Gonadotropin innerhalb von 36 Stunden auf Werte von 0.8 ± 0.4 ng/ml abfällt und auf diesem Niveau bis zur nächsten Luteolyse verbleibt.

Besonderes Augenmerk galt dem Östradiol-17 β . Hier ist im Anschluß an die durch Superovulation und Luteolyse induzierte Sekretion mit LH-assoziierten Spitzenkonzentrationen von 103 ± 80.6 pg/ml (3.1.4.3) je nach Anzahl der angebildeten Graaf'schen Follikel ein konsekutiver Abfall auf Werte < 5 pg/ml innerhalb von 17.6 ± 7.9 Stunden zu verzeichnen. Während der Zeit der folgenden Lutealphase (bis Tag 25) verbleibt Östradiol-17 β bei allen Tieren mit Ausnahme der Kalbin "Rille" in einem Konzentrationsbereich unter 5 pg/ml. Bei der Kalbin "Ronda" währt diese Phase nur 12 Tage (Spontanluteolyse), bei dem Tier "Rexe" nahezu 24 Tage. Die Absicherung dieser Angaben erfolgte durch den Einsatz des HPLC-RIA (2.4.3.).

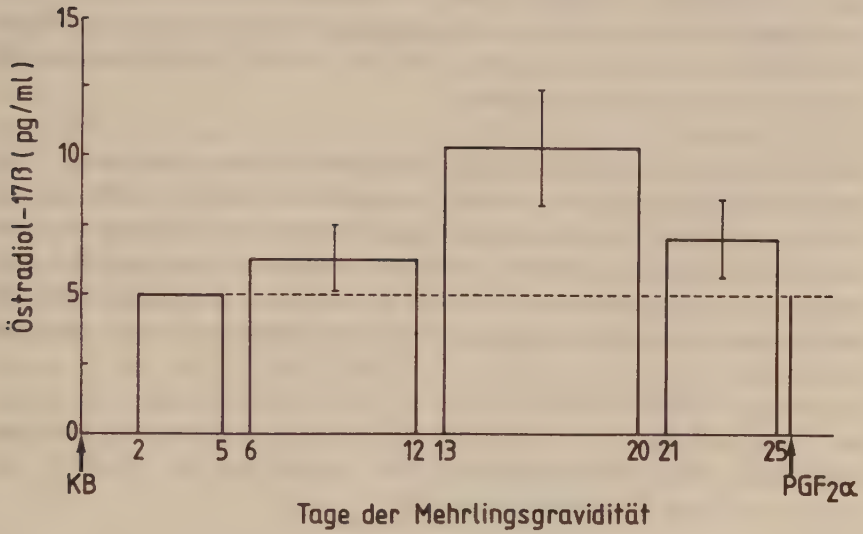
Das Versuchstier "Rille" stellt durch seine besondere Lage der Katheterspitze in diesem Zusammenhang erneut einen Ausnahmefall dar. Die Kalbin ist das einzige der Tiere, bei dem während der Dauer der Mehrlingsgravidität Sekretionen von 17 β -Östradiol unterschiedlichen Ausmaßes nachweisbar waren.

So weist das Sekretionsmuster diese Steroids im Verlauf der Trächtigkeit folgende Verteilung auf (Abb. 11):

Tag 2 - 5	< 5 pg/ml
Tag 6 - 12	6.3 ± 1.2 pg/ml (n = 21)
Tag 13 - 20	10.3 ± 2.1 pg/ml (n = 26)
Tag 21 - 25	7.0 ± 1.4 pg/ml (n = 38)

Etwa 8 - 10 Stunden nach Prostaglandinapplikation am Tag 25 nach KB fällt Östradiol auf Werte unter 5 pg/ml um dann dort bis zur nächsten Brunst zu verbleiben, was darauf hinweist, daß die Unterbrechung der Gravidität auch ein Aussetzen der geringen Östradiolsekretion zur Folge hat.

Abb.11 Verteilung der Östradiol-17 β -Sekretion des Tieres "Rille" während der multiplen Gravidität



3.2. Resultate des Versuchs "Thrombozytenzählung während der frühen Mehrlingsgravidität des Rindes"

Die Thrombozytengesamtzahl je μl Plasma eines Individuums ist keine feststehende Konstante, sondern physiologischen Schwankungen unterworfen. Aufgrund dieses Umstandes konnten die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse der Thrombozytenzählungen immer nur Mittelwerte, gebildet zu verschiedenen Zeitpunkten der multiplen Gravidität, sein. Sie sollten mehr der ersten Abschätzung dienen als Absolutwerte repräsentieren.

Um den sich aus der Gesamtheit der Versuchstiere ergebenden und veränderlichen Durchschnittszahlen einen Basiswert (100%) gegenüber zu stellen, der den Fertilitätszustand vor der Besamung repräsentieren sollte, mußten, mangels Ergebnissen vor der KB, Zahlen der Graviditätstage 8 - 17 und 7 - 15 nach PG in Anlehnung an andere Durchschnittszahlen aus früheren Versuchen heran gezogen werden.

Bei dem Tier mit zwei Kathetern zur Auswahl (F1) wurde bei der Auszählung kein Unterschied zwischen Plasma aus der venösen und der arteriellen Zirkulation gemacht.

Wie aus der Abbildung 12 ersichtlich, ergeben sich möglicherweise 4 verschiedene Blöcke von Thrombozytenzahlen unterschiedlicher Variabilität:

Basiswert (100%)	Graviditätstage 8 - 17, 7 - 15 post PG
1. Block	Tag 1 - 7 der Gravidität
2. Block	Tag 18 - 24 der Gravidität
3. Block	Tag 0 - 6 nach Prostaglandinapplikation

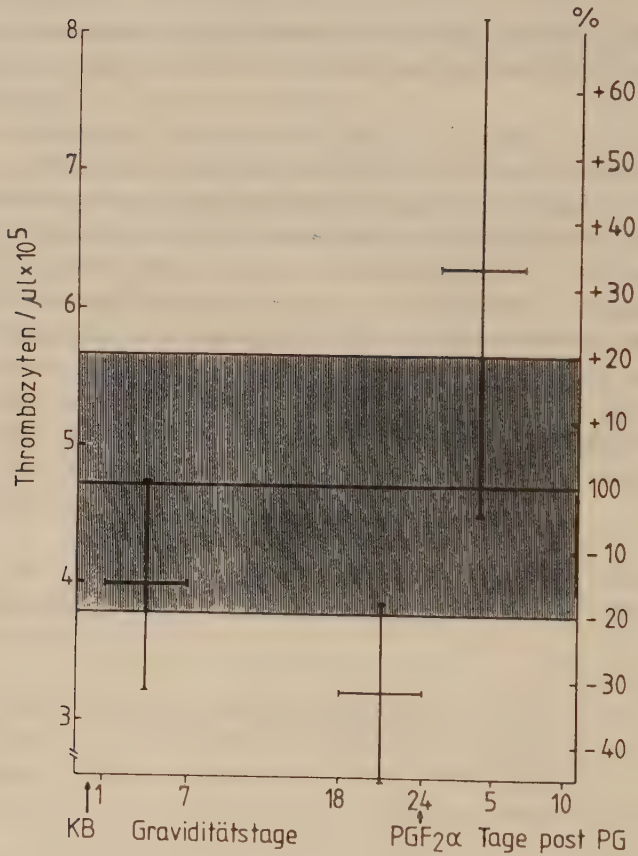
Nähere Einzelheiten über die Thrombozytenzahlen gibt die nachfolgende Übersicht (ohne "Ronda") wieder:

	$\bar{x}$	S.D.	n	VK %	% - Wert
Basiswert	471600	73450	126	19.9	100
1. Block	399350	75300	42	18.9	84.7
2. Block	322200	64900	27	20.1	68.3
3. Block	629400	179650	34	28.5	133.5

(Die in obiger Tabelle wiedergegebenen Zahlen beziehen sich auf Thrombozyten je μ l Plasma und sind auf 50 von 100 gerundet.)

Nach der Besamung kommt es in dem Zeitraum der Graviditätstage 1 bis 7 zu einer mittleren Absenkung der Werte um 15.3%. Im Anschluß daran (Tag 8 - 17) pegeln sich die Thrombozytenzahlen auf den das Grundniveau darstellenden Basiswert (= 100%) ein, um dann in den Tagen 18 - 24 der Gravidität erneut abzufallen auf 68.3% des Grundniveaus. Unmittelbar auf die Luteolyseinduktion 24 Tage nach KB hin erhöhen sich die Thrombozytenzahlen schlagartig bei allen 5 zur Darstellung gekommenen Tieren (ausgen. "Ronda") auf 133.5% der Durchschnittsnorm. Danach fallen sie wieder zurück auf das Niveau der Tage 8 - 17.

Abb. 12 Thrombozytenzahlen während der Mehrlingsgravidität und nach induzierter Luteolyse am Tag 24 nach KB (schematisch; die grau schraffierte Zone reflektiert den "Basiswert" = 100%)



4. Diskussion

4.1. Zur Durchführung einer Superovulation mit FSH-p an Hand von zwei Stimulationsverfahren und anschließender Luteolyse beim Rind

Betrachtet man zunächst die sich nach Luteolyseinduktion im Zyklus ergebenden Hormonprofile der einzelnen Versuchstiere, so zeigt sich hier eine Übereinstimmung mit früheren Publikationen: Das Auftreten der äußeren Brunst 56 Stunden und des LH-Gipfels 70 Stunden (Wert "Nanni" ist hier nicht berücksichtigt, näheres eingehender an späterer Stelle) nach PGF_{2α}-Injektion deckt sich mit den Berichten früherer Arbeiten (Dobson et al. 1975 und Karg et al. 1976).

Die in dem beschriebenen Versuch durchgeführte Superovulation mit porcinem FSH und anschließende Luteolyseinduktion mit einem Prostaglandinanalogue rief bei allen Versuchstieren eine mehr oder weniger deutliche Ovarreaktion hervor, was sich dann auch in den Hormonprofilen widerspiegelte.

Das markanteste Ergebnis ist die Vorverlagerung des präovulatorischen LH-Gipfels und die etwa 20 Stunden früher als im Zyklus auftretende Brunst, womit nahezu alle früheren Berichte anderer Autoren bestätigt werden (Schams et al. 1979, Yadav et al. 1986a, Callesen et al. 1986 u.v.a.). Dieses Geschehen ist umso ausgeprägter, je besser die Tiere auf die Superovulation reagieren, was ja auch Schams und Mitarbeiter (1979) bereits beobachten konnten. Vermutlich ist dies in der im Vergleich zum Zyklus sehr viel größeren Anzahl von angebildeten Follikeln begründet, die eine um ein Vielfaches erhöhte und wesentlich verlängerte (88 Stunden) Sekretion von Östradiol-17 β bedingen. Untermauert wird diese Vermutung durch die Tatsache, daß im Mittel bereits 59 Stunden nach Stimulationsbeginn und 60 Stunden vor dem LH-Gipfel ein meßbarer Anstieg der Östrogenkonzentration im Plasma erfolgt, der dann weiter ansteigt. Dabei fällt auf, daß vor dem LH-Gipfel eine mehrere Stunden andauernde Phase niedriger Konzentrationen vorliegt, was nach Walters und Schallenberger (1984) ursächliche Bedeutung für die Umschaltung von bislang vorliegendem "negati-

ven" auf ein "positives" Feedback von Östradiol auf die Hypothalamus-Hypophysenfunktion hat. Eine strenge Korrelation von Follikelanzahl und Östrogenkonzentration kann nicht postuliert, die Größenordnung jedoch abgeschätzt werden.

Die Gesamtdauer der Brunst ist nach Superovulation gegenüber dem Geschehen im Zyklus um etwa 10 Stunden verlängert und bemerkenswerterweise unabhängig von der Anzahl der Follikel nicht so großen Schwankungen unterworfen. Möglicherweise hat die regelmäßige Applikation von exogenem FSH über einen längeren Zeitraum einen modulierenden Einfluß auf die Östrogenproduktion der ausreifenden Follikel, was indirekt durch die Versuche von Barnes et al. (1982) mit FSH bestätigt wird. Er beobachtet nach einer Superovulation mit FSH im Gegensatz zum Zyklus ein zeitlich sehr kompaktes Auftreten der präovulatorischen LH-Maxima ohne große Schwankungen 41 ± 2 Stunden nach PGF_{2α}-Applikation. Yadav et al. (1986a) berichten von vergleichbaren Brunstdaten.

Das Sekretionsprofil von LH weist im Vorfeld der Brunst auffallende Besonderheiten auf. Während nach Luteolyseinduktion im Zyklus ein deutlich erkennbares, langsames Ansteigen der LH-Basalkonzentrationen vorliegt (Schallenberger et al. 1984, Schallenberger et al. 1985), entfällt dies nach der Luteolyse in der Superovulation ganz. Hier verbleibt LH bei Werten unter 0.7 ng/ml. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte die luteotrope LH-Aktivität des FSH-p darstellen, wie sie schon von Laster (1972b) und Schams et al. (1979) beschrieben wurde. Diese LH-Komponente mag um so mehr zur Geltung kommen, als das Gonadotropin zum Zeitpunkt der Luteolyseinduktion ja noch injiziert wird.

Armstrong und Opavsky (1986) sehen in den geringen LH-Aktivitäten des FSH-p jedoch keinen Nachteil, sondern einen notwendigen Umstand um eine befriedigende Ovarreaktion zu erhalten. Da wir aber zeigen konnten, daß nach Absetzen der FSH-Behandlung eine schnelle Eliminierung aus der Zirkulation vorliegt (Abbildung 4), erscheint diese Hypothese weniger wichtig gegenüber der möglichen stärkeren Hemmung des Gonadotropins durch die höheren endogenen Steroidkonzentrationen in der Proöstrusphase.

Die Progesteronkonzentrationen fallen nach der Luteolyseinduktion mit Cloprostenol innerhalb von 24 Stunden auf Werte unter 1 ng/ml ab und steigen spätestens 72 Stunden nach dem LH-Gipfel wieder auf über 1 ng/ml an. Dabei ergibt sich, wie auch bei Saumande (1977) und Schams et al. (1979), allerdings durch die Blutableitung in der Vena cava wesentlich eindrucksvoller, eine Abhängigkeit von jeweiliger Ovarreaktion und Progesteronanstieg, die eine fast quantitative Aussage über die Anzahl sich anbildender Corpora lutea zuläßt. Vergleicht man die Ergebnisse der rektalen Palpation am Graviditätstag 15 bzw. der diagnostischen Laparatomie mit den zugehörigen Progesteronwerten, so wird zumindest in peripherem Blut ein Gelbkörper durch jeweils ca. 6 bis 8 ng Progesteron reflektiert. Diese Aussage ist jedoch statistisch nicht fundiert. Eine sichere und frühzeitige Differenzierung in gute und schlechte Reagenten einer Superovulation ist somit 3 Tage nach Beginn der Brunst prinzipiell anhand der Progesteronkonzentrationen durchführbar und ermöglicht 3 bis 4 Tage vor einem geplanten Embryotransfer eine eventuelle Aussonderung der nicht, oder schlecht reagierenden Spendertiere. Dies hätte bei regelmäßiger diagnostischer Progesteronuntersuchung erhebliche praktische Bedeutung in Embryotransferprogrammen.

Bedenkt man die Brunstdaten superovulierter Rinder und die Tatsache, daß 80% aller angebildeten Follikel in dem Zeitraum von 15 bis 28 Stunden nach dem LH-Gipfel ovulieren (Yadav et al. 1986a, Callesen et al. 1986), so ergibt sich bei einer Lebensdauer hochverdünnten Kryospermas von ca. 12 - 24 Stunden und einer Kapazitation zwischen 4 und 6 Stunden die theoretische Möglichkeit, mit einer einmaligen Besamung ca. 60 Stunden nach der Luteolyseinduktion eine ausreichende Fertilität zu erreichen. Diese schon von Yadav et al. (1986a) aufgestellte Prognose können wir somit erneut bestätigen, wodurch sich für die praktische Durchführung von zukünftigen Embryotransferprogrammen in Abweichung von der bislang geübten Methode der mehrmaligen Belegung im Abstand von 12 Stunden (1.1.) ein entscheidender arbeitstechnischer Vorteil ergäbe. Dies trifft besonders für die mit der Alzet Minipumpe behandelten Tiere zu, bei denen wesentlich weniger Streuungen bezüglich Brunst und LH-Gipfel auftraten als bei den konventionell stimulierten Tieren.

Nachdem ja alle Versuchstiere denselben Versuchsbedingungen ausgesetzt waren, ist es nun möglich, eine Aussage über die beiden Stimulationstechniken in ihrer Praktikabilität und ihren Auswirkungen zu treffen.

Zunächst zeigt eine Analyse der FSH-Konzentrationen im Plasma der mit der Alzet osmotischen Minipumpe stimulierten Tiere eine kaskadenartige Konzentrationserhöhung des endogenen und exogenen FSH-Spiegels um 75% innerhalb von 36 Stunden (Abb. 4). Ein Zeitraum, der sich exakt mit den bei der herkömmlichen Methode der Injektion gemachten Erfahrungen von Barnes et al. (1982) deckt. Schams und Mitarbeiter (1979) kamen nach Injektion zu grundsätzlich ähnlichen Ergebnissen, allerdings waren die Schwankungen sehr viel ausgeprägter.

Das um 75% erhöhte FSH-Niveau im Plasma wird im weiteren Verlauf der Verweildauer des Implantats bis zu seiner Wiederentfernung aufrecht erhalten. Das Implantat erfüllt also die gestellte Forderung der konstanten Flüssigkeits- und somit Hormonabgabe. Demnach sind die Minipumpen auch beim Rind gut einsetzbar. Die Berichte anderer Autoren (Theeuwes und Eckenhoff 1980, Fara 1985) können bestätigt und auf die Spezies Rind erweitert werden.

Bei der intensiven Brunstbeobachtung schienen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Tieren mit Injektion und Minipumpe zu ergeben. Vergleicht man jedoch die Hormonprofile und die daraus ersichtlichen Zeitspannen, so werden Differenzen deutlich. Bei den durch eine Minipumpe stimulierten Tieren ist unabhängig von der Ovarreaktion ein sehr gleichmäßiges Auftreten des LH-Gipfels 51 Stunden nach Gabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu verzeichnen. Die LH-Maxima der durch Injektion zur Superovulation gebrachten Tiere liegen etwa 10 Stunden später und zeigen größere Schwankungen, die allerdings wie bei Schams et al. (1979) in Abhängigkeit der Follikelanzahl zu sehen sind. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine moderatere FSH-Abgabe der Minipumpen zurückzuführen, wofür auch das zeitlich gleichmäßigere Auftreten der Östrogensekretion und der damit verbundenen Brunstsymptome spricht.

Auf Grund der kleinen Zahl der Versuchstiere können diese Angaben nicht repräsentativ sein, vermögen aber eine Richtung für weiterführende Untersuchungen aufzuzeigen.

Ein weiterer Vorteil der Minipumpen ist die Minimierung des 'Versuchsstress', wie es auch von Fara (1985) postuliert wird. Jede Injektion beinhaltet einen Streß für das Tier. Obgleich dieser nicht objektiv meßbar ist, kann eine Auswirkung gerade auf endokrine Regelmechanismen nicht ausgeschlossen werden (Fara 1985). Neben diesem Aspekt der Streßreduzierung kommt noch der im Vergleich zu den 6 - 8 FSH-Injektionen (1.1.) geringere zeitliche Aufwand der Implantation bzw. der Wiederentnahme 96 Stunden danach hinzu.

Als Alternative zum Triel als Ort der Implantation beim Rind sei an dieser Stelle noch die Perianalfalte empfohlen, da hier bessere Möglichkeiten der lokalen Anästhesie und der Fixation für ein schnelleres, weniger aufwendiges Implantieren gegeben sind. Die Alzet osmotischen Minipumpen gaben während ihrer subkutanen Verweildauer etwas mehr Flüssigkeit als nach den Angaben des Herstellers vorausberechnet ab.

Um diese Diskrepanz bei zukünftigen Einsätzen zu vermeiden, erscheint ein Vorinkubieren mit physiologischer NaCl-Lösung als vorteilhaft.

Die immer wieder geschilderte Problematik der beträchtlichen Variabilität der Stimulationsergebnisse bei den einzelnen Tieren (Schams et al. 1979, Donaldson 1985) wird auch in dem hier beschriebenen Versuch deutlich.

Betrachtet man die Ovarreaktionen aller in diesem Versuch durch Gabe von externem FSH-p zur Superovulation gebrachten Tiere, so fällt auf, daß die Stimulationsergebnisse unabhängig vom Applikationsverfahren großen Schwankungen unterworfen sind. Offenbar läßt sich die individuelle Reaktionsbereitschaft der Eierstöcke auf eine Follikelstimulierung auch durch den Einsatz der Alzet osmotischen Minipumpen nicht positiv beeinflussen.

So legen die erzielten Versuchsergebnisse die bereits von Saumande (1977), Becze et al. (1979) und Schams et al. (1979) getroffene Aussage nahe, der Erfolg einer Superovulation sei hauptsächlich von der individuellen Ausgangslage der Ovarien abhängig, was auch die unterschiedliche Reaktion der Tiere auf eine Superovulation erklären würde. Die Abklärung dieser morphologischen Unterschiede könnte eventuell durch den Einsatz der Ultraschalldiagnostik vor einer Stimulation ermöglicht werden.

Bedenkt man die Unabhängigkeit der Ergebnisse einer Superovulation von den eingesetzten Präparaten (Karg und Schams 1982, Hill et al. 1984), von der Rasse und dem Alter der Tiere (Hasler et al. 1987) und wird die Superovulation mit anschließender Luteolyseinduktion nach den gängigen Gebrauchsmustern (1.1.) durchgeführt, so sind die Resultate, die großen individuellen Unterschiede ausgenommen, wohl reproduzierbar.

Der Einsatz der osmotischen Minipumpen bei einer Superovulation mit FSH verspricht im Vergleich zur Injektion eine durchaus praktikable Alternative zu sein, sie zeigte entscheidende Vorteile bei der Verringerung der Streuung im Auftreten des präovulatorischen LH-Gipfels. Auf Grund der noch nicht kontrollierbaren unterschiedlichen Reaktion der Individuen jedoch scheint es zur Zeit nicht möglich, physiologische Zyklusabläufe adäquat zu simulieren.

4.2. Zur Verschiebung des präovulatorischen LH-Gipfels nach Luteolyseinduktion im Zyklus

Bei dem Tier "Nanni" konnte nach der Luteolyseinduktion in der Zyklusmitte, ausgehend von Progesteronkonzentrationen zwischen 6 und 8 ng/ml, ein initialer Abfall innerhalb von 12 Stunden auf Werte unter 1 ng/ml verzeichnet werden, was sich durchaus mit den Berichten anderer Autoren deckt (Dobson et al. 1975, Karg et al. 1976). Im Anschluß daran verbleibt Progesteron während der nächsten 12 Tage auf diesem Niveau, wohingegen LH ab dem Moment der Luteolyseinduktion anfängt stark zu schwanken, sich aber erst 132 Stunden post PG zum präovulatorischen LH-Maximum erhebt (Abb. 6).

Zeitlich synchron liegt zu diesem Zeitpunkt ein Östrogenanstieg, der 36 Stunden vor dem LH-Gipfel beginnt und wohl das "positive Feedback" (Hansel und Convey 1983) induzierte. In Diskrepanz dazu steht das Auftreten klassischer, äußerer Brunsterscheinungen bereits 72 Stunden nach Prostaglandingabe ohne begleitende Östrogensekretion.

Auch nach der Durchführung eines HPLC-RIA (Abb. 7) haben die ursprünglichen Östrogenwerte mit einer geringen zeitlichen Differenz Bestand. Obwohl Progesteron mit Konzentrationen unter 1ng/ml keine blockierende Wirkung auf die Gonadotropinfreisetzung der Hypophyse im Sinne eines negativen "Feedback" mehr ausübt, kommt es zu keiner östrogeninduzierten Brunst innerhalb des physiologischen Zeitraumes von 3 Tagen (Karg et al. 1976). Durch das Fehlen von ovariellern Östradiol-17 β läßt sich auf eine verzögerte Follikelanbildung oder -Ausreifung schließen, was nach Fehlen des Progesteronblockes nur in einer verminderten FSH-Freisetzung der Hypophyse und/oder einer verminderten GnRH-Ausschüttung des übergeordneten Zentrums (Hypothalamus) erklärt werden kann. In diesem Zusammenhang muß wohl die Aussage von Goff et al. (1986) ergänzt werden, in der die Autoren die bei ihren Versuchen registrierten, fehlenden LH-Gipfel ausschließlich mit der Blockadewirkung von Progesteronkonzentrationen über bzw. um 1 ng/ml nach der Luteolyse begründen.

Eine einleuchtende Erklärung könnte sich aus einem Umstand ergeben, der sich beim Studium der Versuchsprotokolle offenbart. Gerade zu dem Zeitpunkt der Luteolyseinduktion litt das Tier an einem beidseitigen Rusterholz'schen Sohlengeschwür der Hintergliedmaßen was sich auch in seinem Allgemeinbefinden durch eine verminderte Futteraufnahme niederschlug. Möglicherweise hat dieser endogene Streß auf zentralnervösem Wege oder durch Corticoidausschüttung der Nebennierenrinde eine hemmende Wirkung auf die Gonadotropinfreisetzung und damit die Follikelanbildung. Bestätigt würde diese Vermutung durch die vollkommen im Durchschnitt der anderen Tiere liegenden Brunstdaten von "Nanni" (Tab. 7) während der Superovulation eine Woche später, zumal das Tier zu diesem Zeitpunkt infolge kurativer Behandlung kein gestörtes Allgemeinbefinden mehr zeigte.

Obige Begründung stünde auch im Einklang mit dem Ergebnis von Schallenberger et al. (1982), die im Modellversuch durch Corticoidinjektionen Streß simulierten und eine Suppression der LH-Freisetzung bei ovariectomierten Rindern erreichten. Eine weitere Bestätigung unserer These liefert Bielanski (1985). Er simuliert Streß bei mit FSH-p superovulierten Rindern durch Injektion von Dexamethason und zeigt eindrucksvoll die hemmende Wirkung des Corticoids auf das Follikelwachstum.

Eine Erklärung für das Auftreten äußerer Östruserscheinungen der "Nanni" zu einem Zeitpunkt der follikulären Östrogeninaktivität kann nicht gegeben werden. Wahrscheinlich hat sich das Tier von seiner Boxennachbarin und deren Brunstverhalten "mitreißen" lassen, zumal letztere eine "echte" Brunst inklusive Östrogensekretion und anschließendem LH-Gipfel aufwies (3.1.3.). Obgleich unsere Tiere mit PGF_{2α} zyklusssynchronisiert waren, wäre ein zum Teil auf Pheromonwirkung zurückzuführender Synchronisationseffekt denkbar, wie er bereits bei anderen Spezies (Maus, Primaten) beschrieben wurde (Karg, 1985b).

"Streß" jeder Art und Herkunft ist infolge seiner schwierigen Objektivierbarkeit nach wie vor ein Problem, das sich möglicherweise in Versuchen individuell verschieden resultatsverfälschend auswirken kann, insbesondere wenn man die Vielzahl der frequenten Blutentnahmen und Injektionen bei einer Superovulation bedenkt. Berichte anderer Autoren über fehlende oder abnormale LH-Profile (Greve et al. 1984, Donaldson 1985, Callesen et al. 1986, Goff et al. 1986) deuten darauf hin. Die schonendere, streßminimierende Art der Langzeitapplikation von FSH mit Minipumpen mag ein Schritt in die richtige Richtung sein.

4.3. Zur Luteolyseinduktion bei bestehender Mehrlingsgravidität

Nach der Superovulation mit künstlicher Besamung wurden 5 der Tiere offensichtlich multipel gravid, da die Progesteronwerte über den Zeitraum der physiologischen Luteolyse hinaus bis zum Graviditätstag 24 (23) hoch blieben und sich auf einem gewissen Niveau einpendelten. Alle diese Tiere wiesen während der super-

ovulatorischen Brunst Progesteron- und LH-Profile auf, die den Angaben früherer Publikationen entsprechen (1.1 und 4.1.). Lediglich ein Tier ("Ronda") verhielt sich abnormal, denn es zeigte ab Tag 11 einen spontanen Progesteronabfall, in dessen Verlauf es aber erst nach 7½ Tagen zu einem präovulatorischen LH-Gipfel kam. Eine zweite spontane Luteolyse setzte beim Tier "Rexe" am Graviditätstag 23 ein. Sie benötigte sogar 11 Tage bis zu einem LH-Maximum.

Eine Erklärung für die Spontanluteolyse im Falle "Ronda" könnten die hohen Progesteronkonzentrationen von mehr als 1 ng/ml während des LH-Gipfels sein, was eine sehr niedrige LH-Freisetzung bedingte und sich dadurch vielleicht negativ auf die Luteinisierung auswirkte.

Bei dem Tier "Rexe" ist dies nicht der Fall, gleichwohl es nach 23 Graviditätstagen zu einem Abfall der Progesteronwerte innerhalb von 72 Stunden unter 1 ng/ml kommt. Denkbar wäre auch eine gegenseitige Behinderung der Embryonen im Uterus während der Implantationsphase und/oder ein früher Embryonaltod anderer Genese bedenkt man den morphologischen Entwicklungsstand des Embryos in diesem Stadium (Leiser 1975). Dies abzuklären ist uns mit den hier zu Verfügung stehenden Mitteln jedoch nicht möglich.

Unabhängig davon, ob die Luteolyse spontan oder induziert einsetzte, weisen alle Tiere eine über die Maßen lange Zeit von im Mittel 12 Tagen von Beginn der Luteolyse bis zum nächsten LH-Gipfel auf (Tab. 7). Auch die nachfolgenden Zyklen sind durchschnittlich mit 25 Tagen um 4 Tage verlängert (Tab. 7). Dies ist umso ausgeprägter, je besser die Tiere auf die Superovulation reagiert hatten, d.h. je mehr Corpora lutea am Ovar vorlagen.

Dadurch könnten auch die langen Zeitspannen zwischen Wegfallen des Progesteronblocks und der nachfolgenden Brunst erklärt werden. Da durch die Superovulation offensichtlich alle auf den Eierstöcken vorhandenen Tertiärfollikel stimuliert und zur Ovulation gebracht wurden, bedarf es bei der nachfolgenden Brunst einer geraumen Zeit, um neue Tertiärfollikel aus dem vorhandenen Potential der Primär- bzw. Sekundärfollikel unter dem Einfluß von

Gonadotropinen heranreifen zu lassen. Dies träfe besonders gerade für die Tiere mit den besten Stimulationsergebnissen zu, die am längsten bis zu einer erneuten Östradiolsekretion und Brunst benötigten. Zudem sind die schwach ausgeprägten Östruserscheinungen von nur kurzer Dauer und mit nur geringen Östradiol-17 β -Freisetzungen verbunden (3.1.5.2.).

Nicht im Gegensatz zu obiger Begründung steht die lange Zeitdauer bis die Luteolyse vollständig ist. Die Progesteronkonzentrationen benötigen nach einem initialen Abfall auf Werte < 5 ng/ml unterschiedlich lange (14 Stunden - 9 $\frac{1}{2}$ Tage), um auf Werte unter 1 ng/ml zu fallen. Auch hier ist eine Abhängigkeit von der Ovarreaktion feststellbar (Abb. 10).

Die mit dem Steroid gesättigten Fettdepots und die Vielzahl der eventuell noch teilaktiven Gelbkörper je nach Stimulationserfolg mögen eine Erklärung dieses Umstandes abgeben. Außerdem spielt Östradiol-17 β eine entscheidende Rolle in der Konditionierung der endogenen Prostaglandinsynthese (McCracken et al. 1981). Erschwerend mag hinzugekommen sein, daß hier kaum meßbare Konzentrationen dieses Steroids vorlagen.

Die bei dem Tier "Rille" permanent um 2 ng/ml verbleibenden Progesteronwerte sind vermutlich mit der guten Position der Katheterspitze zu erklären (Schwäbl 1987), die es erlaubte relativ wenig verdünntes Blut in der vena cava zu erfassen. Trotz dieses Progesteronblockes ist bei dem Tier, wenngleich erst nach 11 Tagen (3.1.5.2.), ein LH-Gipfel begleitet von einer schwachen Östrogenfreisetzung zu verzeichnen, was durchaus an die bereits geäußerte These (4.1.) von einer differenzierten Progesteronhemmung der Hypothalamus-Hypophysenachse erinnert.

Auf Grund der gefundenen Resultate und den aus ihnen gezogenen Schlüssen bedeutet die Stimulation zur Superovulation beim Rind wohl einen massiven Eingriff in das endokrin-morphologische Regulationssystem des Reproduktionstraktes, der vom Tier mit einer unterschiedlich langen Phase der hormonellen Adaptierung beantwortet wird.

4.4. Hormonelle Sekretionsmuster während der Tage 1 - 24 der frühen Mehrlingsgravidität

Durch die Superovulation und anschließende Besamung kann zumindest bei 4 Tieren von einer multiplen Trächtigkeit unterschiedlicher Embryonenanzahl ausgegangen werden. Geht man davon aus, daß ein einziger Konzeptus im Stande ist, dem mütterlichen Organismus innerhalb der ersten zwei Wochen seine Anwesenheit zu signalisieren, so beinhaltet das Ausbleiben der Luteolyse in unserem Falle ein unter Umständen multiples Signal und eine multiple Trächtigkeit.

Die je nach Blutableitung hohen Progesteronkonzentrationen bleiben bis zur Luteolyseinduktion bestehen und würden somit eine Gravidität bestätigen. Die von Schallenberger et al. (1986) trotz eines fortbestehenden negativen "Feedback" durch Progesteron beobachteten LH-Freisetzungen höherer Amplitude ab dem Tag 14 der Gravidität konnten hier, wohl aufgrund der starken Progesteronhemmung, nicht bestätigt werden.

Östradiol-17 β fällt unmittelbar nach der superovulatorischen Brunst bei allen Tieren auf Werte unter 5 pg/ml, um erst bei der nächsten Brunst wieder anzusteigen.

Eine Ausnahme macht das Tier "Rille", bei der wohl aufgrund einer besonders guten Katheterposition eine Östradiolsekretion während der Gravidität feststellbar war. Der ab dem Tag 5 bis zum Tag 25 der Trächtigkeit (3.1.6., Abb.11) erfolgte, diskontinuierliche Östrogenanstieg bei der Kalbin "Rille" ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht follikulären sondern uterinen Ursprungs, da gerade bei diesem Tier bei der diagnostischen Laparatomie nur Corpora lutea aber keine Follikel festgestellt wurden. Man konnte deshalb davon ausgehen, daß das "Follikelpotential" soweit erschöpft sein und deshalb keine östrogenproduzierenden Interöstrusfollikel zur Verfügung stellen würde, wie es von Glencross und Pope (1981) sehr eindrucksvoll postuliert wird.

Der von Schallenberg et al. (1986) geäußerte Verdacht, der Konzeptus könne eine geringe Östrogenproduktion aufweisen, kann bei Vorliegen einer Mehrlingsgravidität durch Messung in peripherem Blut nicht bestätigt, bei Messung im Vena-cava-Blut aber auch nicht ausgeschlossen werden. Es muß weitergehenden Untersuchungen überlassen werden, dieses genauer zu erforschen.

4.5. Thrombozytenzahlen des Rindes in Abhängigkeit der multiplen Frühgravidität

Die objektive Erfassung der Thrombozytenzahlen einer Population wird durch die großen Schwankungen unter den einzelnen Individuen erschwert (Rota und Christofori 1975, Hogger 1986). Zudem stellt die Ermittlung des Thrombozytenstatus in der Art und Weise der Konservierung, Aufbereitung und Auszählung eine Fehlerquelle dar (Weisberg 1973, Stöhr 1983).

Der von Weisberg (1973) beobachtete (25%) und von Stöhr (1983) in geringerem Ausmaß (8%) bestätigte, sich depressiv auf die Thrombozytenzahlen auswirkende Zeitfaktor zwischen Blutentnahme und Auszählung bei EDTA-Blut konnte in diesen Versuchen nicht gefunden werden. Der Aussage von Hogger (1986), NH_4 -Heparin als Gerinnungszusatz liefere stabilere Zählaliquots als EDTA, muß auf Grund unserer Ergebnisse (2.3.4.) widersprochen werden. Der bei additiver Wirkung aller Faktoren maximale, in alle Meßdaten konstant mit eingehende methodische Fehler von ca. 17% und die vielen subklinisch-pathologischen Einflüsse (Heilmeyer 1951, Kraft und Dürr 1981) relativieren die Verlaufskurven der Thrombozyten zur Tendenz, zumal die Bestimmung physiologischer Grundwerte vor Versuchsanfang entfiel (3.2.).

Die von O'Neill (1985a) eindrucksvoll beschriebene Thrombozytopenie in den ersten 5 Graviditätstagen der Maus, die ausschließlich an das Vorhandensein eines Befruchtungsproduktes gebunden und mit der Anzahl der Embryonen positiv korreliert war, kann nur teilweise für das Rind bestätigt werden. Es konnte zwar eine relative Absenkung der Blutplättchenzahlen in den Graviditätstagen 1 - 7 um 15.3% verzeichnet werden (Abb. 12), diese darf aber dann, ver-

glichen mit einer Thrombozytopenie des einfach graviden Rindes von 18.5% (Hogger 1986), nicht als positiv korreliertes, multiples Signal wie bei O'Neill (1985a) gewertet werden. Demzufolge kann der Arbeitshypothese nicht beigeprpflichtet werden, daß nach Superovulation beim Rind eine Thrombozytopenie um ein vielfaches ausgeprägter sein müßte (Hogger 1986).

Die Rückkehr der Thrombozytenzahlen ab dem Tag 8 bis zum Tag 17 der multiplen Gravidität zu "physiologischen" Werten könnte unter dem Aspekt der nun auch im peripheren Blut ansteigenden Progesteronkonzentrationen gesehen werden, nachdem Rota und Christofori (1975) eine progesteronbedingte Thrombozytose nachweisen konnten. Im Widerspruch dazu steht aber die in unserem Versuch deutlich erkennbare Erniedrigung der Thrombozytenzahlen um etwa 32% (3.2., Abb. 12) an den Graviditätstagen 18 - 24. Ein über das Progesteron dominierender, depressiv auf den Thrombozytenstatus wirkender Östrogeneinfluß follikulären (Glencross und Pope 1973) oder auch embryonalen (Abele 1987) Ursprungs ist wohl theoretisch denkbar, kann aber aufgrund der nachgewiesenen niedrigen Östrogenkonzentrationen in dieser Zeit ausgeschlossen werden.

Ein eventueller Zusammenhang des deutlichen Anstiegs der Thrombozytenzahlen auf 133.5% der "Norm" an den Tagen 0 - 6 nach der Lutecolyseinduktion in der multiplen Gravidität kann durch die Uterusreaktion beim Abort oder durch das Prostaglandin analog bedingt sein. Unter diesen Umständen wäre durchaus ein Zusammenhang zwischen (multipler) Gravidität und Thrombozytenzahlen denkbar, aber nicht auf der Basis der Steroide, sondern wie schon von vermutet als Reaktion auf ein nicht näher definiertes Protein embryonalen Ursprungs, das, frühzeitig an den maternalen Organismus abgegeben, eine Thrombozytopenie zur Folge hat (O'Neill 1985b). Untermauert würde diese These durch die relative Thrombozytopenie während der Gravidität und die deutliche Thrombozytose unmittelbar nach Abbruch der Trächtigkeit (Abb. 12). Dazu kommt, daß Rota und Mitarbeiter (1975) die Auswirkungen der Steroide auf die Zahl der Blutplättchen bei zyklischen, nichtgraviden Rindern untersuchten und somit physiologisch und morphologisch von einem vollkommen anderen Reproduktionsstadium ausgingen.

Trotz der Vielfalt der die Resultate beeinflussenden Faktoren wie subklinische Infektionen, Streß, Meßfehler und dergleichen, ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein direkter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit eines Konzeptus und den Thrombozytenzahlen des mütterlichen Organismus zu vermuten. Es muß weiterführenden, insbesondere intensiveren Untersuchungen vorbehalten sein, diese sicherlich vielversprechenden Zusammenhänge restlich aufzuklären.

5. Zusammenfassung

Es wurden sechs weibliche Rinder nach Zyklossynchronisation mit einem Prostaglandinanalogue (Cloprostenol) mittels porcine FSH (Burns-Biotec, 40 mg) zur Superovulation gebracht. Dabei wurden zwei Stimulationsverfahren (s.c. Injektion und Alzet osmotische Minipumpe) an je drei Tieren parallel eingesetzt. Nach erfolgter Doppelbesamung im Abstand von 12 Stunden durchliefen die Tiere die Phase der (multiplen) Frühgravidität bis zum Tag 24 an dem eine Luteolyse mit Cloprostenol eingeleitet wurde. Im Anschluß daran wurden ohne weitere Behandlung die Zyklusdaten der Einzeltiere über den Zeitraum von 3 Wochen bis zum Versuchsende nach insgesamt 77 Tagen dokumentiert.

An Hand der den Tieren implantierten Dauerkatheter wurden Blutentnahmen unterschiedlicher Frequenz durchgeführt und das Plasma nach Versuchsende radioimmunologisch auf die Steroidhormone Progesteron und Östradiol-17 β sowie auf LH und teilweise FSH untersucht. Bei Östradiol-17 β wurde im Gegensatz zu den restlichen Hormonen vor der Bestimmung eine Extraktion durchgeführt und die Ergebnisse des Radioimmuntests (RIA) durch den stichprobenartigen Einsatz der Hochleistungs - Flüssigkeitschromatographie (HPLC) abgesichert.

Zusätzlich zu den Blutprobenentnahmen wurden bei allen Tieren für die Dauer von 5 Wochen, beginnend mit dem Tag der Besamung, mindestens einmal täglich die Thrombozyten ausgezählt und die verschiedenen Einflußfaktoren auf die Zählergebnisse abgeklärt.

Die superovulierten Rinder zeigten Stimulationsergebnisse unterschiedlichen Ausmaßes. Alle Tiere wiesen im Durchschnitt einen im Vergleich zum Zyklus um etwa 20 Stunden in die Brunst vorverlagerten, präovulatorischen LH-Gipfel auf. Dieses Geschehen war umso ausgeprägter, je besser die Tiere auf die Stimulation reagierten. Es wird vermutet, daß dies auf die vermehrte Östrogenproduktion der jeweils angebildeten Follikel zurückzuführen ist.

Der Vergleich der beiden Stimulationsverfahren ergab keine prinzipiellen Unterschiede. Die Minipumpen erzielten innerhalb von 36 Stunden einen Anstieg des FSH-Plasmaspiegels um 75%. Der Einsatz der osmotischen Minipumpen scheint jedoch infolge eines zeitlich engeren Auftretens der Brunst und des LH-Gipfels sowie des geringeren Aufwandes eine praktikable, wenn nicht gar überlegene Alternative zur Injektion zu sein.

Die Ovarreaktion erfolgt individuell verschieden und unabhängig von der Stimulationstechnik, was mit der unterschiedlichen Ausgangslage der Eierstöcke vor Stimulationsbeginn begründet wird.

Bei einem Versuchstier konnte der LH-Gipfel bei der Luteolyseinduktion im Zyklus erst 132 Stunden nach der Prostaglandingabe festgestellt werden, obwohl die Kuh schon nach 72 Stunden Brunstsymptome zeigte. Diese Erkenntnis wurde anhand des HPLC-RIA abgesichert. Es wird gezeigt, daß dies sehr wahrscheinlich die Folge von endogenem Streß und Corticoidausschüttung aufgrund eines schweren Klauenleidens war.

Bei 2 Tieren war in der nachfolgenden, multiplen Gravidität eine Spontanluteolyse am Tag 11 bzw. 23 zu verzeichnen. Bei den restlichen 4 Kühen wurde die Luteolyse durch Gabe von PGF_{2α} am Tag 24 induziert. Unabhängig von der Art der Luteolyse dauerte es bei allen Tieren nach initialem Abfall von Progesteron unterschiedlich lange (6 - 27 Tage) bis zum Auftreten des nächsten LH-Gipfels. Dieses Geschehen war bei den Tieren mit den besten Ovarreaktionen am stärksten ausgeprägt und mit undeutlichen Brunsterscheinungen vergesellschaftet.

Wir vermuten eine zeitlich limitierte Depression der Ovarfunktion und finden ihre Ursachen in dem massiven Eingriff, den eine Superovulation mit der vollständigen Stimulierung aller vorhandener Tertiärfollikel für die Eierstöcke darstellt. Als Folge davon sind auch die anschließenden Zyklen mit 25 ± 2 Tagen verlängert.

Auch bei multipler Gravidität sind nur sehr geringe Östradiolspiegel sowohl im zentralen wie auch peripheren Blut nachweisbar.

Die relative Thrombozytopenie des maternalen Organismus in den ersten 5 Tagen nach erfolgter Befruchtung steht wohl in einem Zusammenhang mit der Gravidität, zumal sie von einer zweiten, stärker ausgeprägten in den Tagen 18 - 24 gefolgt wird. Die relative Thrombozytose in den 6 Tagen nach der Abortinduktion am Tag 24 wird mit dem Absterben des Befruchtungsprodukts oder der Wirkung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ erklärt.

Summary

Secretion of ovarian steroids during superovulation, multiple pregnancy and after induced abortion in cattle.

Six cows were superovulated with FSH-p (Burns-Biotec, 40 mg) after being synchronized by an injection of cloprostenol. Two techniques (s.c. injection and Alzet osmotic minipump) were applied in three animals either.

After 2 artificial inseminations within 12 hours the phase of (multiple) early pregnancy was studied until luteolysis was induced by administering PGF_{2α} at day 24. Thereafter cycles of all animals were shown without any more treatment.

Blood was taken in varying frequencies using permanent catheters having been implanted the cows before. Plasma was analysed for progesterone, estradiol-17β, LH and partly FSH by using specific radio-immuno-assays (RIA). Estradiol-17β was the only hormone which was determined by RIA after an extraction, all others were measured in plasma by a direct assay. Results of the estradiol-measurement were randomly evaluated by a high performance liquid chromatography (HPLC).

In addition to taking blood samples platelets were counted at least once daily in all animals during five weeks beginning the day of insemination. Various factors were examined which probably might influence the counting results.

The cows treated for superovulation showed different results of stimulation. The preovulatory LH-peak occurred approximately 20 hours earlier coinciding with the standing estrous. It is suggested that this is caused by the additional production of estradiol-17β of multiple numbers of follicles induced by superovulation.

Generally there are no differences between both methods of FSH-application. In animals treated with the osmotic pump plasma concentrations of FSH increased to 175% of basic levels 36 hours

after implantation of the pumps. We suggest that using the mini-pumps in superovulation will probably have beneficial consequences on timing of heat and LH-peak. Therefore and because of the less expenditure in time the osmotic minipumps are likely to be more practical to superovulate cattle than the usual method of injection. The ovarian reaction after superovulation, however, is independent of the mode of application but not independent of the different ovarian status before starting treatment.

In one animal the preovulatory LH-peak was discovered as late as 132 hours after administering cloprostenol in the control cycle although the cow showed estrous already 72 hours after PGF_{2α} treatment. These results were validated and confirmed by a HPLC-RIA assay. It is presumed that rising endogene cortisol levels due to stress caused by a sole ulceration are responsible for this phenomenon.

In two animals luteolysis occurred spontaneously at days 11 and 23 of pregnancy respectively. In the other 4 cows luteolysis was induced by administering cloprostenol at day 24 of pregnancy. After an initial decrease of progesterone in all animals it took a various time until the next LH-peak associated with weak signs of estrus was figured out (6 - 27 days). This delay was observed particularly in cows having had the best ovulatory response.

It is suggested that superovulation in cattle is a very strong manipulation stimulating all follicles of the ovaries and inducing a temporary ovarian insufficiency. As another consequence the following cycles were prolonged (25 ± 2 days).

In peripheral plasma there was no measurable production of estradiol-17 β caused by (multiple) embryos.

Relative thrombocytopenia observed in maternal plasma during the first 5 days of pregnancy and followed by another one at days 18 - 24 is concluded to be the result of pregnancy. Relative thrombocytosis occurring during 6 days after inducing abortion at day 24 is probably caused by the induced abort or may also be a direct effect of prostaglandin F_{2α}.

Literaturverzeichnis

- Abele E. (1987)
Ovarielle und uterine Steroid- und Prostaglandin-Sekretion
während der ersten 5 Wochen der Gravidität beim Rind
Diss. med. vet., Universität München
- Alcivar A.A., Maurer R.R. und Anderson L.L. (1984)
Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, progesterone
and estradiol-17 β secretion in superovulated beef heifers
Proc. 10th Int. Congr. Animal Reproduction AJ, Vol. III, 303-305
- Arbeiter K. (1978)
Der Kaiserschnitt beim Rind
in : Richter J. und Götze R., Tiergeburtschilfe, 476-482
- Armstrong D.T. und Opavsky M.A. (1986)
Biological characterization of a pituitary FSH preparation with
reduced LH activity
Theriogenology 25, 135
- Barnes M.A., Castellano A.M., Kazmer G.W., Wade R.J. und
Halman R.D. (1982)
Effect of exogenous FSH on estrus, ovulation and endogenous
hormone release in dairy cows
Theriogenology 18, 311-323
- Becze J., Meszaros J. und Perjes I. (1979)
Untersuchungen zur Verbesserung des Superovulationserfolges bei
Kühen
Zuchthygiene 14, 26-30
- Bernard C., Valet J.P., Beland R. und Lambert R.D. (1983)
Prediction of bovine ovulation by a rapid radioimmunoassay for
plasma LH
J. Reprod. Fert. 68, 425-430
- Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Randall G.C.B.
und Mitchell D. (1980)
Collection, description and transfer of embryos from cattle 10-16
days after oestrus
J. Reprod. Fert. 59, 205-216
- Bouters R., Moyaert I., Coryn M. und Vandeplasse M. (1983)
The use of a PMSG antiserum in superovulated cattle :
endocrinological changes and effects on timing of ovulation
Zuchthygiene 18, 172-177
- Bielanski A. (1985)
Ovarian response and cortisol and progesterone blood levels in
superovulated heifers treated with Dexamethasone
Theriogenology 23, 178
- Bindon S.M., Piper L.R., Cahill L.P., Driancourt M.A.
und O'Shea T. (1986)
Genetic and hormonal factors affecting superovulation
Theriogenology 25, 53-70

- Booth W.D., Newcomb R., Strange H., Rowson L.E.A.
und Sacher H.B. (1975)
Plasma oestrogen and progesterone in relation to superovulation
and egg recovery in the cow
Vet. Rec. 97, 366-369
- Brandt A. und Hoogenkamp B. (1982)
Embryotransfer
in : Grunert E. und Berchthold M., 1982
Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind
Verlag Paul Parey, Berlin
- Callesen H., Greve T. und Hyttel P. (1986)
Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated
cattle
Theriogenology 25, 71-86
- Casida L.E., Meyer R.R., McShan W.H. und Wisnicky W. (1943)
Effects of pituitary gonadotropins on the ovaries and induction
of superfecundity in cattle
Am.J.Vet.Res. 4, 76-94
- Chignard M., Le Couedic J.P., Tence M., Vargaftig B.B. und
Benveniste J. (1979)
The role of platelet activation factor in platelet aggregation
Nature 279, 799-800
- Christenson R.K., Echternkamp S.E. und Laster D.B. (1975)
Oestrus, LH, ovulation and fertility in beef heifers
J. Reprod. Fert. 43, 543-546
- Claus R. und Karg H. (1981)
Fortpflanzung
in : Kräusslich H., 1981
Rinderzucht
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Crisman R.O., McDonald R.E. und Wallace C.E. (1980)
Oviduct (uterine tube) transport of ova in the cow
Amer. J. Vet. Res. 41, 645-647
- Dekhuyzen (1901)
zit. nach Stöhr
- Dhondt D., Bouters R., Spincemaille J., Coryn M. und
Vandeplasse M. (1978)
The control of superovulation in the bovine with a PMSG-antiserum
Theriogenology 9, 529-534
- Dobson H., Cooper M.J. und Furr B.J.A. (1975)
Synchronisation of oestrus with I.C.I. 79.939, an analogue of
PGF_{2α} and associated changes in plasma progesterone, oestradiol-
17β and LH in heifers
J.Reprod.Fert. 42, 141-144
- Dören M., Schlegel W. und Schneider H.P.G. (1986)
Lokale Effekte von PGF_{2α}, PGE₂ und Indometazin beim Kaninchen
in : Fortschritte der Fertilitätsforschung 13, 77-80

- Donaldson L.E. (1985)
LH and FSH profiles at superovulation and embryo production in the cow
Theriogenology 23, 441-447
- Donne (1842)
zit. nach Stöhr
- Eckenhoff B. und Yum S.I. (1981)
The osmotic pump : novel research tool for optimizing drug regimens
Biomaterials 2, 89
- Eckert H.G. und Strecker H. (1978)
Prinzip und Anwendung des Radioimmunassays
Naturwissenschaften 65, 245-249
- Elsden R.P., Lewis S., Cumming I.A. und Lawson R.A. (1974)
Superovulation in the cow following treatment with PMSG and prostaglandin F_{2α}
J. Reprod. Fert. 36, 455-456
- Elsden R.P., Nelson L.D. und Seidel G.E. (1978)
Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin
Theriogenology 9, 17-26
- Etherington W.G., Kilmer B.A., Burke J.E., Montgomery M.E. und Wilson D.C. (1986)
Pregnancy rates related to stage of estrous cycle at prostaglandin treatment in an embryo transfer recipient herd
Theriogenology 25, 845-854
- Fantl und Ward (1956)
zit. nach Stöhr
- Fara J.W. (1985)
Osmotic delivery systems for research
Methods in Enzymology 112, 470-484
- Foote R.H. und Onuma H. (1970)
Superovulation, ovum collection, culture and transfer. A review
J. Dairy Sci. 53, 1681-1692
- Ford S.P. und Chenault J.R. (1981)
Blood flow to the corpus luteum-bearing ovary and ipsilateral uterine horn of cows during the oestrus cycle and early pregnancy
J. Reprod. Fert. 62, 555-562
- Franke und Horwitz (1932)
zit. nach Stöhr
- Gadsby J.E. (1982)
Steroid hormones in blastocyst tissue, uterine flushings and endometrium of pig, sheep and cow
in : Proteins and Steroids in Early Pregnancy (Beier H.M. and Karlson P. Eds.), Springer, Berl.- Heidelberg.- New York, 173-182

- Glencross R.G. und Pope G.S. (1973)
Concentrations of oestrogens and progesterone in the systemic plasma of cows
Anim. breed. Abstr. 41, 534ff.
- Glencross R.G. und Pope G.S. (1981)
Concentrations of oestradiol-17 β and progesterone in the plasma of dairy heifers before and after Cloprostenol-induced and natural luteolysis and during early pregnancy
Anim. Reprod. Sci. 4, 93-106
- Görlach A. und Hahn R. (1983)
Zur technischen Durchführung von Embryo-Transfer-Programmen des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch e.V.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 90, 425-427
- Goff A.K., Greve T., Bousquet D. und King W.A. (1986)
Progesterone and luteinizing hormone profiles in heifers used as oocyte donors
Theriogenology 26, 577-586
- Gordon I., Williams G. und Edwards J. (1962)
The use of serum gonadotrophin (PMS) in induction of twin pregnancy in the cow
J.agric.Sci., Camb. 59, 143
- Greve T. (1976)
Egg transfer in the bovine: effect of injecting PMSG on different days
Theriogenology 5, 15-19
- Greve T., Callesen H. und Hyttel P. (1984a)
Characterization of plasma LH-profiles in superovulated dairy cows
Theriogenology 21, 237
- Greve T., Callesen H. und Hyttel P. (1984b)
Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated dairy cows
Theriogenology 21, 238
- Hammond J. (1949)
Induced twin ovulations and multiple pregnancy in cattle
J.agric.Sci., Camb. 39, 22
- Hansel W. und Convey E.M. (1983)
Physiology of the estrous cycle
J. Anim. Sci. 57, 404-423
- Hasler J.F., McCauly A.D., Lathrop W.F. und Foote R.H. (1987)
Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program
Theriogenology 27, 129-169
- Hayem (1878)
zit. nach Stöhr
- Heilmeyer L. (1969)
zit. nach Stöhr

- Henricks D.M., Hill J.R., Dickey J.F. und Lamond D.R. (1973)
Plasma hormone levels in beef cows with induced multiple
ovulations
J. Reprod. Fert. 35, 225-233
- Hill K.G., Looney C.R., Schiewe M.C. und Godke R.A. (1984)
Effect of different lot numbers of follicle stimulating hormone
(FSH-p) on superovulation response of donor cattle
Theriogenology 21, 241
- Hill K.G., Bondioli K.R. und Looney C.R. (1986)
Use of a norgestomet implant in conjunction with follicle
stimulating hormone (FSH) for superovulation of donor cattle
Theriogenology 25, 160
- Hittmair A. (1963)
Handbuch der allgemeinen Hämatologie
Verlag Urban & Schwarzenberg, München
- Hoeffler G. und Oette K. (1974)
Vergleichende Untersuchungen über 4 Thrombozytenzählverfahren
Klin. Chem. Biochem. 5, 198
- Hoffmann B. (1977)
Bestimmung von Steroidhormonen beim weiblichen Rind; Entwicklung
von Meßverfahren und physiologische Daten
Verlag Paul Parey, Berlin - Hamburg, Fortschritte der
Veterinärmedizin, Heft 26
- Hoffmann B., Kyrein H.J. und Ender M. (1973)
An efficient procedure for the determination of progesterone by
radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma
Hormone Research 4, 302-310
- Hogger H. (1986)
Thrombozytenaktivierung während der Frühgravidität beim Rind
Diplomarbeit, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau,
TU München - Weihenstephan
- Jensen M.A., Greve T., Madej A. und Edqvist L.E. (1982)
Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF_{2a} treated
cow
Theriogenology 18, 33-44
- Karg H., Hartl M., Hoffmann B., Schams D., Schmidt W.,
Günzler O., Huber E. und Müller S. (1976)
Versuche mit einem Prostaglandinanalogue zur Zyklussynchronisation
beim Rind unter hormonanalytischer und klinischer Kontrolle
Zuchthygiene 11, 7-18
- Karg H. (1985a)
Neue Dimensionen in der Endokrinologie und ihre Bedeutung für die
Tierproduktion
Der prakt. Tierarzt 2, 103 ff.
- Karg H. (1985b)
Pheromone
in : Bewegte Medizin, 41-58
Symposium in München, herausgegeben von Josef Zander

- Kauffold P. und Thamm I. (1985)
Zustandsbeurteilung von Rinderembryonen - Arbeitsanleitung für
den Embryotransfer
Forschungsbericht Zentr. Tierprod. Dummerstorf/Rostock
- King M.E., Kiracofe G.H., Stevenson J.S. und Schalles R.R. (1982)
Effect of stage of the estrus cycle on interval to estrus after
PGF_{2a} in beef cattle
Theriogenology 18, 191-200
- Komiya E. (1965)
Die zentralnervöse Regulation des Blutbildes
Thieme Verlag, Stuttgart
- Kraft W. und Dürr U.M. (1981)
Kompendium der klinischen Labordiagnostik
Verlag M.u.H. Schaper, Hannover
- Kummer V., Zraly Z., Holcak V., Veznik Z., Schlegelova J. und
Hruska K. (1980)
Superovulation in cattle : effect of goat anti-PMSG serum
Theriogenology 14, 383-390
- Laster D.B. (1972a)
Disappearance and uptake of FSH in the rat, rabbit, ewe and cow
J. Reprod. Fert. 30, 407-415
- Laster D.B. (1972b)
Follicular development in heifers infused with follicle
stimulating hormone
J. Reprod. Fert. 28, 285-289
- Lauria A., Oliva O., Genazzani A.R., Cremonesi P., Crotti S. und
Barbetti M. (1982)
Improved method to induce superovulation in cattle using human
menopausal gonadotropin (HMG)
Theriogenology 18, 357-364
- Leiser R. (1975)
Kontaktaufnahme zwischen Trophoblast und Uterusepithel während
der frühen Implantation beim Rind
Anat., Histol., Embryol. 4, 63-86
- Lindsell C.E., Pawlyshyn V., Bielanski A. und Mapletoft R.J. (1985)
Superovulation of heifers with FSH-p beginning on four different
days of the cycle
Theriogenology 23, 203
- Looney C.R., Boutte B.W., Archbald L.F. und Godke R.A. (1981)
Comparison of once daily and twice daily FSH injektionen for
superovulating beef cattle
Theriogenology 15, 13-22
- McBride B.L., Bessoudo E., Bowen M.J. und Kraemer D.C. (1986)
Antiprogesterone reversal of progesterone-induced rapid transport
of ova in superovulated cattle
Theriogenology 25, 170

McCracken J.A., Schramm W., Barcikowski B. und Wilson I. (1981)
The identification of prostaglandin $F_{2\alpha}$ as an uterine luteolytic
hormone and the hormonal control of its synthesis
Acta vet. scand., Suppl. 77, 71-88

Meyer H.H.D., Schallenberger E. und Feck H. (1986)
Secretion of prostaglandins in cattle during early pregnancy
Acta endocrinol. 111, Suppl. 274, 40-41

Mizuno N.S. und Sautter J.H. (1958)
zit. nach Stöhr

Moghissi K.S. (1980)
Prediction and detection of ovulation
Fert. Steril. 34, 89-98

Moor R.M. und Rowson L.E.A. (1966)
Local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryos
transferred to various isolated portions of the uterus
J. Reprod. Fert. 12, 539-550

Müller W. und Weinreich I. (1956)
Immun-pancytopenia
Klin. Wschr. 34, 505-509

O'Neill C. (1985a)
Thrombocytopenia is an initial maternal response to fertilization
in mice
J. Reprod. Fert. 73, 559-566

O'Neill C. (1985b)
Examination of the causes of early pregnancy-associated
thrombocytopenia in mice
J. Reprod. Fert. 73, 567-577

Pawlyshyn V., Lindsay C.E., Braithwaite M. und Mapletoft R.J. (1986)
Superovulation of beef cows with FSH-p : a dose-response trial
Theriogenology 25, 179

Rajakowsky E. (1960)
The ovarian follicular system in sexually mature heifers with
special reference to seasonal, cyclical and left-right variations
Acta. endocr. (Kbh.), Suppl. 52

Refsal K.R. und Seguin B.E. (1980)
Effect of stage of diestrus and number of cloprostenol
(ICI 80.996) injections on intervals to estrus, LH peak and
ovulation in heifers
Theriogenology 14, 37-47

Rodrigues J.L. und Gregory R.M. (1986)
Superovulatory response in cows following administration of FSH-p
and prostaglandin
Theriogenology 25, 190

Roselius R. (1985)
Transferergebnisse mit Rinderembryonen in Nückel/Bremerhaven
1983/1984
Dtsch. tierärztl. Wschr. 92, 11-12

Roskam J. (1969)
zit. nach Stöhr

Rota E. und Cristofori F. (1975)
Numerical variations in the platelets in blood taken from the
jugular vein of cattle, in relation to the stage of the oestrus
cycle
Folia vet. lat. 5, 191-202

Sasaki K. und Ito T. (1981)
Effects of estrogen and progesterone on the spleen of the mouse :
a light and electron microscopic study
Arch. histol. jap. 44, 203-213

Saumande J. (1977)
Relationships between ovarian stimulation by PMSG and steroid
secretion
EEC-Seminar "Control of reproduction in the cow", Galway

Saumande J. und Chupin D. (1982)
The relationship in the response of ovaries of superovulated
heifers
Theriogenology 17, 107

Saumande J., Tamboura D. und Chupin D. (1985)
Changes in milk and plasma concentrations of progesterone in cows
after treatment to induce superovulation and their relationships
with number of ovulations and of embryos collected
Theriogenology 23, 719-731

Savage N.C. und Mapletoft R.J. (1984)
Superovulation in the cow utilizing estradiol-17 β or
gonadotrophin releasing hormone in an FSH-p regimen
Theriogenology 21, 259

Schallenger E. (1977)
Radioimmunologische Follitropin (FSH)-Bestimmungen beim Rind,
methodische Entwicklungsarbeiten und physiologische Ergebnisse
Diss. med. vet., Universität München

Schallenger E., Oerter U. und Hutterer G. (1982)
Neuroendocrine regulation of postpartum function
J. Anim. Sci. 20, 123-147

Schallenger E., Schams D., Bullermann B. und Walter D.L. (1984)
Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and
ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the
corpus luteum in the cow
J. Reprod. Fert. 71, 493-501

Schallenger E., Schöndorfer A.M. und Walters D.L. (1985)
Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes
of concentrations in the jugular vein throughout the oestrous cycle
Acta Endocrinol. 108, 312-321

Schallenger E., Rampp J. und Walters D.L. (1985)
Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. II. Pulsatile changes
of concentrations in the jugular vein throughout pregnancy
Acta Endocrinol. 108, 332-330

Schallenberg E., Meyer H.H.D., Schams D. und Karg H. (1986)
Alternative hormonale Mechanismen zur Erhaltung der Frühgravidität
beim Rind
in : Fortschritte der Fertilitätsforschung 13, 16-23

Schallenberg E., von Veh F. und Schwäbl M. (1987)
Induktion von Superovulation und Luteolyse: Simulierung
physiologischer Abläufe?
Zuchthygiene Vol.22 (3), 112-113

Schams D. und Karg H. (1969)
Radioimmunologische LH-Bestimmung im Blutserum vom Rind unter
besonderer Berücksichtigung des Brunstzyklus
Acta Endocrinologica 61, 96-103

Schams D., Höfer F., Schallenberg E., Hartl M. und Karg H. (1974)
Pattern of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating
hormone (FSH) in bovine blood plasma after injektion of a
synthetic gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH)
Theriogenology 1, 137-151

Schams D. und Schallenberg E. (1976)
Heterologous radioimmunoassay for bovine follicle stimulating
hormone and its application during the oestrous cycle in cattle
Acta Endocrinol. 81, 461-473

Schams D., Menzer Ch., Schallenberg E., Hoffmann B., Prokopp
A., Hahn B. und Hahn R. (1979)
Superovulation beim Rind : Hormonprofile bei Stimulation mit
Serumgonadotropin (PMSG) bzw. hypophysärem FSH
Zuchthygiene 14, 11-25

Schams D. und Karg H. (1982)
Hormonal responses following treatment with different
prostaglandin analogues for estrous cycle regulation in cattle
Theriogenology 17, 499-513

Schneebeli J. und Döbeli M. (1984)
Klinische und hormonanalytische Untersuchungen über das Vorkommen
nicht ovulierender Follikel in der post-partum-Phase des Rindes
Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 231-247

Schneider U. und Hahn J. (1979)
Bovine embryo transfer in Germany
Theriogenology 11, 63-80

Schulz H., Jürgens R. und Hiepler E. (1958)
Die Ultrastruktur der Thrombozyten bei der konstitutionellen
Thrombopathie mit einem Beitrag zur submikroskopischen Orthologie
der Thrombozyten
Thromb. Diath. Haemorrh. Stuttgart 2, 300-323

Schulz H. und Landgräber E. (1966)
Untersuchungen über die Adsorption und Phagozytose von Viren
Klin. Wschr. 44, 998

Schwäbl M. (1987)
Zur Luteolyse beim Rind während verschiedener Reproduktionsstadien
Diplomarbeit, Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau,
TU München - Weihenstephan

Short R.E., Randel R.D., Staigmiller R.B. und Bellows R.A. (1979)
Factors affecting estrogen-induced LH release in the cow
Biol. Reprod. 21, 683-689

Sreenan J.M. und Gosling J.P. (1977)
The effect of cycle stage and plasma progesterone level on the
induction of multiple ovulations in heifers
J. Reprod. Fert. 50, 367-369

Stöhr B. (1983)
Thrombozytenzählung bei verschiedenen Pferderassen unter
Praxisbedingungen (mit Einmaltests)
Diss. med. vet., Universität München

Stone G., Kraemer D.C., Harms P.G. und Schake L.M. (1984)
Superovulation, nonsurgical embryo collection and rebreeding of
early postpartum Brangus Cows
Theriogenology 21, 265

Tanabe T.Y. und Hann R.C. (1984)
Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers
treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$ - influence of stage of cycle at
treatment
J. Animal Sci. 58, 805

Tenhumberg H., Szilvassy B., Kruff B., Pokorny R.
und Hunziker F. (1984)
Different methods of synchronizing embryo transfer donor cows
Theriogenology 21, 267

Thatcher W.W., Knickerbocker J.J., Helmer S.D., Hansen P.J.,
Bartol F.F., Roberts R.M. und Bazer F.W. (1985)
Characteristics of conceptus secretory proteins and their effect
on $PGF_{2\alpha}$ secretion by the maternal endometrium in cattle
in : Early Pregnancy Factors, Perinatology Press, Ithaca, 35-28

Theeuwes F. (1987)
The elementary osmotic pump
J. Pharm. Sci. 64, 1975

Theeuwes F. und Eckenhoff B. (1980)
Applications of osmotic drug delivery
in : Controlled Release of Bioactive Materials, Baker R.,
Academic Press, N.Y., 61

Walters D.L. und Schallenberger E. (1982)
Pulsatile secretion of estradiol (E2) and progesterone (P4)
during the estrous cycle of the cow
J. Steroid Biochem. 17, Abstract Nr. 270

Walters D.L. und Schallenberger E. (1984)
Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and
ovarian oxytocin during the periovulatory phase of the oestrus
cycle in the cow
J. Reprod. Fert. 71, 503-512

- Walters D.L., Schams D. und Schallenger E. (1984)
Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and
ovarian oxytocin during the luteal phase of the estrous cycle in
the cow
J. Reprod. Fert. 71, 479-491
- Watts T.L. und Fuquay J.W. (1985)
Response and fertility of dairy heifers following injection with
prostaglandin F_{2α} during early, middle or late diestrus
Theriogenology 23, 655-661
- Weisberg G. (1973)
zit. nach Stöhr
- Wildt D.E., Woody H.D. und Dukelow W.R. (1975)
Induktion of multiple ovulation in the cow with single injections
of FSH and hCG
J. Reprod. Fert. 44, 583-586
- Wiley H.E., Bowen M.J., Massey J.M., Amoss M.S., Blake R.W.
und Kraemer D.C. (1982)
The effect of FSH on sperm transport in cattle
Theriogenology 17, 113
- Williams M.T. und Marsh J.M. (1978)
Estradiol inhibition of luteinizing hormone-stimulated
progesterone synthesis in isolated bovine luteal cells
Endocrinology 103, 1611-1618
- Wright J.H. (1906)
Die Entstehung der Blutplättchen
Virchows Arch. path. Anat. 186, 55
- Yadav M.C., Walton J.S. und Leslie K.E. (1986a)
Timing of the onset and duration of ovulation in superovulated
beef heifers
Theriogenology 26, 509-521
- Yadav M.C., Walton J.S. und Leslie K.E. (1986b)
Plasma concentrations of luteinizing hormone and progesterone
during superovulation of dairy cows using follicle stimulating
hormone or pregnant mare serum gonadotrophin
Theriogenology 26, 523-540
- Yum S.I. und Wright R.M. (1980)
Drug delivery systems based on diffusion and osmosis
in : Controlled Release of Bioactive Materials, Baker R.,
Academic Press, N.Y., 76-87
- Zalesky D.D., Thayer K.M., Forrest D.W., Welsh T.H., Bondioli
K.R., Looney C.R. und Hill K.G. (1986)
Relationships between endocrine and ultrasound evaluation of
ovulation in superovulated cows
Theriogenology 25, 220

Herrn Professor Dr.Dr.h.c. Heinrich Karg möchte ich für die Aufgabenstellung sowie für die guten Arbeitsbedingungen in dem von ihm geleiteten Institut danken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. vet. Dr. agr. habil. E. Schallenger für seine geduldige und verständnisvolle Unterstützung in allen Problemen, für seine kompetente Versuchsplanung und seine ständige Bereitschaft zur Hilfestellung und Diskussion.

Desweiteren bedanke ich mich bei Dr. H.H.D. Meyer, seinem engsten Mitarbeiter Dr. M. Rapp und bei seinem gesamten Arbeitsteam für die fachkundigen und stets verfügbaren Ratschläge und Hilfen in der Durchführung der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie. Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Geduld und Toleranz gegenüber meiner individuellen Arbeitsweise. Nicht zuletzt seien an dieser Stelle die Mitarbeiter der Versuchsstation "Veitshof" genannt.

Hervorheben möchte ich die äußerst fruchtbare und harmonische Zusammenarbeit mit meinen engsten Mitarbeitern Frau Inge Kaindl und Herrn Martin Schwäbl, durch deren unermüdlichen Einsatz die zügige und umfassende Auswertung der zahlreichen Plasmaproben in der kurzen Zeit erst möglich wurde.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Prof. Dr.W. Groth, Herrn Dr. med. vet. Gränzer und Frau Nadler aus dem Institut für Tierhygiene der Technischen Universität München für die großzügige Überlassung eines elektronischen Zellzählgerätes, was mir meine Arbeit sehr erleichterte.

Ohne den fachkundigen Rat und die aktive Hilfestellung in Material und Technik von Herrn Dipl.-Ing. W. Gallmeier wäre mir die Erstellung der vorliegenden Dissertation mit Hilfe der elektronischen Datenverarbeitung nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

Name	Florian von Veh
geboren	23. Mai 1955 in Kelheim, Niederbayern
Eltern	Fred von Veh, Diplom-Ingenieur Helene von Veh, geb. Esenbeck, Hausfrau

Schulischer und beruflicher Werdegang

1961 - 1965	Volksschule in Kelheim
1965 - 1974	Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium in Kelheim
1974 - 1976	Zeitsoldat bei der Bundeswehr in Landshut/Ndb.
1976 - 1978	Infolge des Numerus clausus Angestellter der Rhein-Main-Donau AG, München
1978 - 1983	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Januar 1984	Approbation als Tierarzt
1984 - 1986	Angestellter als praktischer Tierarzt in der kurativen Groß-/Kleintierpraxis Dr.A.Grassl/ Dr.K.-H.Heizer in Landshut, Niederbayern
1986 - 1987	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weihenstephan der Technischen Universität München Während dieser Zeit Anfertigung der vor- liegenden Dissertation

